



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PRODUKCE LIPIDŮ POMOCÍ RŮZNÝCH DRUHŮ
KVASINEK**

PRODUCTION OF LIPIDS BY DIFFERENT YEAST STRAINS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

David Ponížil

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Szotkowski

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1531/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **David Ponižil**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Martin Szotkowski**

Název bakalářské práce:

Produkce lipidů pomocí různých druhů kvasinek

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- přehledná literární rešerše zaměřená na srovnání metabolismu kvasinek rodu *Metschnikowia*, *Yarrowia* a *Rhodospiridium*
- Screening produkce lipidů vybranými kmeny kvasinek
- Optimalizace složení produkčních médií s využitím nutričního stresu
- Srovnání produkce biomasy, lipidů a složení mastných kyselin jednotlivými kmeny
- Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

David Ponižil
student(ka)

Ing. Martin Szotkowski
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na kultivaci vybraných druhů kvasinek a jejich produkci lipidů, které mají mnohostranné využití například při výrobě biopaliv nebo produktů potravinářského průmyslu. Lipidy tvoří základní biomolekuly, které jsou součástí biomembrán v živých organismech. V teoretické části je popsána stavba, chemické složení a výživa těchto mikroorganismů. Dále jsou zde charakterizovány použité kmeny kvasinek a v neposlední řadě také lipidické metabolity. Experimentální část je orientována na popis přípravy živných médií, ve kterých byly kvasinky kultivovány. Byl sledován celkový podíl lipidů a lipidických metabolitů v biomase a provedeno srovnání mezi jednotlivými kmeny kvasinek, s využitím různého složení produkčních médií. Kultivace kvasinek probíhala při různých C/N poměrech, za použití rozdílných zdrojů uhlíku a dusíku, byly využity také odpadní substráty jakožto zdroje uhlíku a dusíku ve srovnání s klasickými zdroji. V neposlední řadě bylo provedeno srovnání profilu mastných kyselin produkovaných vybranými kvasinkami s mastnými kyselinami, které jsou obsaženy v rostlinných olejích a másle. Ze série experimentů bylo vypořizováno, že největší podíl lipidů v biomase byl pozorován u kmene *Rhodospiridium toruloides* v případě využití odpadního substrátu živočišného tuku.

Klíčová slova

Oleogenní kvasinky, karotenoidy, lipidy, nutriční stres, odpadní látky, HPLC/ PDA, GC/FID

Abstract

The bachelor's thesis is focused on the cultivation of selected species of yeast. It is proven that these lipids have many uses and can be applied in the production of biofuels or food industry products. Lipids are forming basic biomolecules that are part of biomembranes in living organisms. The theoretical part describes the structure, chemical composition, and nutrition of these microorganisms. Furthermore, this work contains the characteristic not only of the yeast strains used but also of the lipid metabolites. The experimental part is focused on the description of the preparation of the culture medium designed for yeast growth. The total proportion of lipids and lipid metabolites in the biomass was monitored and compared to individual yeast strains grown on culture media with different compositions. The yeast was cultivated on mediums with carbon and nitrogen from different sources and in different ratios. Waste substrates were also used as carbon and nitrogen sources to compare them to conventional sources. The profile of fatty acids produced by selected yeasts was compared to the fatty acids contained in vegetable oils and butter. The series of experiments showed that the largest proportion of lipids in biomass was observed in the strain *Rhodosporidium toruloides* grown on a waste substrate of animal fat.

Key words

Oleogenic yeasts, carotenoids, lipids, nutritional stress, waste substances, HPLC/ PDA, GC/FID.

PONÍŽIL, David. *Produkce lipidů pomocí různých druhů kvasinek*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123944>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Szotkowski.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně odcitoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

V Brně dne 30. 7. 2020

.....

podpis autora

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Martinu Szotkowskému, za poskytnuté rady a informace, které mi vždy ochotně poskytl při zpracovávání mé bakalářské práce. A v neposlední řadě rodině a přátelům za psychickou podporu.

Obsah

1	ÚVOD	11
2	Teoretická část	12
2.1	Kvasinky	12
2.2	Stavba kvasinek	12
2.2.1	Buněčná stěna	12
2.2.2	Cytoplazmatická membrána.....	13
2.2.3	Cytoplazma a organely	13
2.2.4	Jádro	14
2.3	Chemické složení kvasinek	14
2.3.1	Voda	14
2.3.2	Sacharidy.....	14
2.3.3	Lipidy	15
2.3.4	Minerální látky	15
2.3.5	Organické látky	15
2.4	Výživa kvasinek	15
2.4.1	Voda	15
2.4.2	Uhlík	16
2.4.3	Dusík	16
2.4.4	Kyslík	17
2.4.5	Anorganické soli	17
2.5	Lipidy.....	17
2.5.1	Základní rozdělení lipidů	17
2.5.2	Produkce lipidů kvasinkami.....	18
2.5.3	Metabolismus Lipidů	18
2.5.4	Vnitrobuněčné lipidy	19

2.5.5	Fosfolipy	22
2.5.6	Mimobuněčné lipidy	22
2.6	Steroly a karotenoidy	22
2.6.1	Steroly	23
2.6.2	Karotenoidy	24
2.7	Oleogenní kvasinky	25
2.7.1	Kvasinky rodu <i>Rhodospiridium</i>	26
2.7.2	Kvasinky rodu <i>Yarrowia</i>	27
2.7.3	Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	28
2.8	Růst kvasinek	29
2.8.1	Jednorázová kultivace	29
2.8.2	Kultivace přítoková	29
2.8.3	Kultivace kvasinek v baňkách na třepacích stojích	29
2.8.4	Fáze rozmnožování	30
2.9	Biochemie kvasinek	30
2.9.1	Stanovení Lipidů	31
2.9.2	Mechanismus využití dusíkatých sloučenin	31
3	Cíl práce	32
4	Experimentální část	33
4.1	Použité chemikálie	33
4.1.1	Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek	33
4.1.2	Chemikálie použité pro HPLC	33
4.1.3	Chemikálie použité pro extrakce a transesterifikace	33
4.2	Použité kvasinky	34
4.3	Přístroje a pomůcky	34
4.4	Kultivace kvasinek	34

4.4.1	Inokulum I. a II.	35
4.4.2	Produkční médium	36
4.4.3	Příprava odpadních substrátů	38
4.4.4	Stanovení nárůstu biomasy a následné zpracování pro analýzy	39
4.4.5	Transesterifikace lipidů.....	39
4.4.6	Izolace karotenoidů a dalších lipidických metabolitů.....	39
4.4.7	Analýza lipidů pomocí GC	40
4.4.8	Analýza lipidických látek a karotenoidů pomocí HPLC	40
5	Výsledky a diskuze	41
5.1	Zkoumání vlivu nutričního stresu.....	41
5.2	Kultivace kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i>	41
5.2.1	Kultivace při poměru C/N 13.....	41
5.2.2	Kultivace při poměru C/N 25.....	43
5.2.3	Kultivace při poměru C/N 50.....	44
5.2.4	Kultivace při poměru C/N 100.....	46
5.3	Kultivace kmene <i>Yarrowia lipolytica</i>	48
5.3.1	Kultivace při poměru C/N 13.....	48
5.3.2	Kultivace při poměru C/N 25.....	49
5.3.3	Kultivace při poměru C/N 50.....	51
5.3.4	Kultivace při poměru C/N 100.....	53
5.4	Kultivace kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	54
5.4.1	Kultivace při poměru C/N 97.....	54
5.4.2	Kultivace při poměru C/N 150.....	56
5.5	Kultivace kmene <i>Metschnikowia chrisoperlae</i>	58
5.5.1	Kultivace při poměru C/N 97.....	58
5.5.2	Kultivace při poměru C/N 150.....	59

5.6	Porovnání výsledků s rostlinnými oleji a másly	61
6	Závěr	64
7	Seznam použitých zdrojů	66
8	Seznam použitých zkratk	69
9	Seznam obrázků	70
10	Seznam tabulek	73
11	Přílohy	74

1 ÚVOD

Důležitost kvasinek je podtržena každodenní spotřebou chleba a kvašených nápojů. Nedávný pokrok v biotechnologii zvýšil závislost mnoha lidí na těchto mikroorganismech, díky jejich produkci látek aplikovaných v léčivech a jiných výrobcích. Kvasinky jsou fylogeneticky rozmanitou skupinou charakterizovanou jednobuněčným růstem. Jsou využívány již po tisíceletí, a to především díky jejich schopnosti kvašení. Oleogenní kvasinky jsou charakteristické díky své schopnosti vytvářet lipidy ve větší míře. Právě tyto mikrobiální lipidy jsou v poslední době významné z důvodu své všestranné využitelnosti. Některé z těchto mikroorganismů mají schopnost produkce lipidů s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, a proto jsou často využívány ve farmaceutickém průmyslu. Schopnost těchto kvasinek využívat ke svému růstu různé kultivační substráty a také odpadní produkty, snižuje jejich kultivační cenu, a díky tomu se stávají více populární pro využití v biotechnologickém průmyslu.

Problémem posledních let je klesající množství fosilních paliv a každodenní závislost populace na palivech jako takových. Z těchto důvodů byla zahájena produkce bionafty a k její výrobě jsou využívány různé druhy rostlin, jako například slunečnice nebo řepka. Obsah uhlovodíků zodpovědných za znečištění životního prostředí, který se uvolňuje při využívání bionafty, je v tomto případě nižší než při spotřebě fosilních paliv. Její produkce ovšem vyžaduje obrovské plochy zemědělské půdy, hnojiv a velké množství sladké vody. Výnos surovin pro tvorbu bionafty je ovlivněn také podmínkami prostředí, ve kterém se pěstují. Tyto suroviny se využívají primárně v potravinářském průmyslu, proto zde existuje jistá konkurence mezi výrobou potravin a bionafty. Na rozdíl od výroby bionafty založené na kulturách rostlin, je produkce mikrobiologických biopaliv nezávislá na počasí a umožňuje kontrolu tvorby potřebných lipidů. V zemědělství a potravinářství je produkováno velké množství odpadních substrátů, které nejsou dále využívány. Biotechnologické výzkumy se v současné době zaměřují na využití těchto odpadních látek pro růst a kultivaci kvasinkovitých mikroorganismů. Ke snížení ekonomických a environmentálních problémů lze potravinové odpady využít k produkci biolipidů oleogenními kvasinkami v mnoha odvětví.

Stěžejním tématem bakalářské práce je tvorba lipidů prostřednictvím kvasinek rodu *Rhodospiridium*, *Yarrowia* a *Metschnikowia*. Je zde popsána stavba kvasinek, chemické složení a jejich výživa. Práce je zaměřena na změnu různých zdrojů uhlíku a dusíku při využití rozdílných poměrů koncentrace uhlíku k dusíku v živném mediu, kdy cílem bylo dosažení co nejlepších výsledků s využitím odpadních substrátů, pro následné vytvoření látek s přidanou hodnotou.

2 Teoretická část

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou mikroskopické houby s různorodým rozměrem, který je závislý na jejich rodu a kultivačních podmínkách ve kterých se nacházejí. Obvykle dosahují rozměrů kolem 3-4 μm . Za základní tvar buňky se udává rotační elipsoid. Jsou charakterizovány jako heterotrofní organismy, zdrojem jejich energie a živin jsou živé a neživé organické látky. Kvasinkovité buňky získávají svou výživu produkcí a uvolňováním různých proteolytických, glykolytických anebo lipolytických enzymů pro trávení organických látek, nebo absorpci aminokyselin a monosacharidů skrz buněčnou stěnu. Reprodukují se prostřednictvím pučení nebo štěpení. Kvasinky jsou považovány za fakultativní anaeroby, což znamená, že mohou přežít a růst v přítomnosti nebo nepřítomnosti kyslíku. K rozmnožování kvasinek dochází za aerobních podmínek, buňky přeměňují kyslík a cukry na oxid uhličitý a energii prostřednictvím oxidačního metabolismu, což umožňuje efektivní růst kvasinek. Za anaerobních podmínek jsou využívány pro výrobu kvašených nápojů a etanolu. Za těchto podmínek dochází k fermentaci neboli kvašení, z čehož vyplývá jejich pojmenování. Jedná se o proces, ve kterém dochází k přeměně monosacharidů, disacharidů a trisacharidů na oxid uhličitý a ethanol. Celkem bylo objeveno přes 1500 druhů kvasinek s tím, že se jedná pouze o 1 % z celkové existence. S kvasinkami se ve velké míře setkáváme v přírodě, ve vzduchu, v půdě a některé druhy také parazitují na hmyzu, zvířatech či člověku. Nejvíce se ovšem vyskytují na substrátech obsahujících cukr. Mnoho druhů kvasinek produkuje prospěšné látky jako například vitamíny, pigmenty a enzymy. Ovšem ne všechny jejich vlastnosti jsou prospěšné. V potravinářském průmyslu bývají častým zdrojem kontaminace. Existují také patogenní kvasinky, které mohou být původci nemocí u lidí s oslabenou imunitou. [1, 2, 3, 4]

2.2 Stavba kvasinek

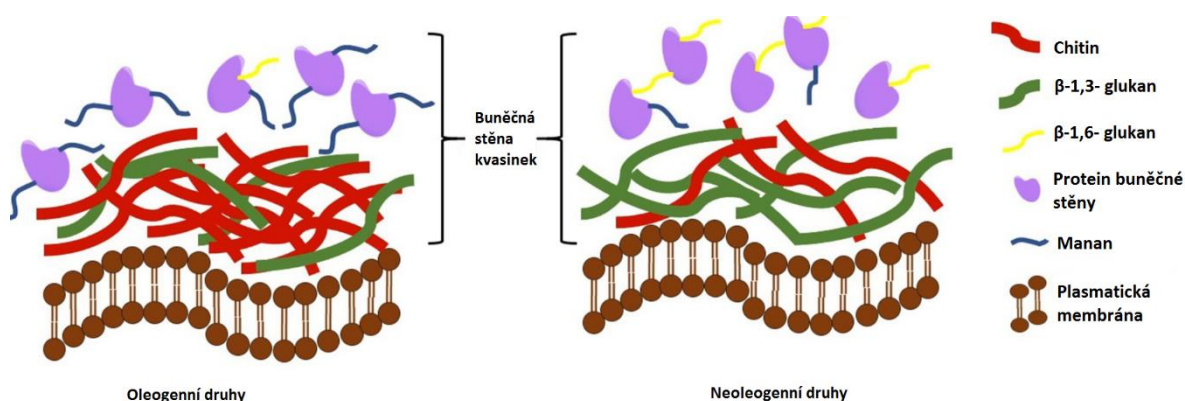
Kvasinky jsou tvořeny buněčnou stěnou, cytoplazmatickou membránou, cytoplazmou, organelami a jádrem.

2.2.1 Buněčná stěna

Povrch buněk kvasinek tvoří buněčná stěna, která má za úkol její ochranu před mechanickým poškozením a zároveň určuje tvar její buňky. Je tvořena propletenými řetězci polysacharidů, tvořícími její strukturu. Vlákná polysacharidů jsou vyplněná bílkovinami a nepatrným množstvím lipidů a fosforečnanů. Karboxylové skupiny tvořící bílkoviny a fosfátové zbytky dávají buněčné stěně záporný náboj, který je důležitý pro absorpci látek z vnějšího prostředí. [1, 3, 5]

2.2.1.1 Buněčná stěna oleogenních kvasinek

Buněčná stěna těchto mikroorganismů se obecně skládá z (1->3)-D-glukanů, β (1->6)-D-glukanů, mananproteinů a chitinu. Úkolem glukanů je vytvářet tvar buňky a dodávat jí dostatečnou pružnost. Komplex β (1->3)-D-glukan-chitin je důležitou součástí vnitřní buněčné stěny vytvářející vláknitou strukturu stěny. Vnější a vnitřní stěna je spojena β (1->6)-D-glukanem. β -(1->6)-D-glukan se podílí na kovalentních vazbách s β (1->3)-D-glukanem, mananproteiny a chitinem. Uvedené zesíťování přispívá k modulární struktuře buněčné stěny. Oleogenní kvasinky mají ve srovnání s neoleogenními kvasinkami obecně ve své stěně vyšší podíl chitinu nebo mananu, což vede ke zvýšení rigidity a odolnosti vůči lýze (Obrázek č. 1)



Obrázek č. 1: Srovnání buněčné stěny oleogenních a neoleogenních kvasinek [6]

Buněčná stěna kvasinek je vysoce dynamická struktura a mění své složení v závislosti na okolních podmínkách. Obsah polysacharidů buněčné stěny se mění s typem zdroje uhlíku, omezení dusíku, pH, teploty, provzdušněním a způsobem kultivace. [6]

2.2.2 Cytoplazmatická membrána

Struktura cytoplazmatické membrány kvasinek je tvořena proteiny a fosfolipidy, které vytvářejí osmotické rozhraní ve vnitřní části buňky a vnějším prostředím. Mohou jí volně prostupovat jen malé molekuly, které neobsahují žádný náboj. [1, 3]

2.2.3 Cytoplazma a organely

Prostředí kolem membránových organel vyplňuje cytosol, který může obsahovat části různých zásobních látek například volutin či glykogen. Mohou to být také enzymy nukleosidy či meziprodukty metabolismu. Mezi nejdůležitější organely patří mitochondrie, ve kterých se nachází centrum dýchacích enzymů a sídlo oxidační fosforylace. Dále pak endoplazmatické retikulum, kde dochází k syntéze proteinů a lipidů, Golgiho aparát důležitý kvůli transportu prekurzorů přes cytoplazmatickou membránu a vakuoly ve kterých dochází k rozkladu látek díky hydrolytickým enzymům. [1, 3, 5]

2.2.4 Jádro

Jádro kvasinek má kulovitý tvar a je umístěno ve středu buňky. Je ohraničeno dvojitou jadernou membránou od cytosolu, obsahuje DNA a histony. Díky endomitóze probíhá v kvasinkách dělení jádra bez rozrušení jaderné membrány. Z tohoto důvodu je obtížné zjistit přesný počet a stavbu jejich chromozomů. [3]

2.3 Chemické složení kvasinek

Chemické složení kvasinek je ovlivněno mnoha faktory, jako je voda, sacharidy, lipidy, minerální a organické látky. Pro obsah uvedených látek je důležité stáří kvasinky, použitý substrát, typ kvasinky či doba kvašení.

Tabulka č. 1: Koncentrace složek sušiny v kvasničné buňce [3]

Složka	Koncentrace [%]
Proteiny	50
Sacharidy	30-35
Nukleové kyseliny	10
Minerální látky	6-12
Lipidy	4-12
Organické látky	0,09-0,15

2.3.1 Voda

Hlavní složkou protoplazmy kvasinkové buňky je voda a její obsah se pohybuje kolem 65–80 %. Voda vázaná uvnitř buněk (intracelulární) tvoří 80 % z celkového kvanta a zbývající část je voda vázaná povrchovými silami (volná voda). Dále hrají důležitou roli také dusíkaté látky, obzvláště jednoduché a složené bílkoviny s prostetickými skupinami, které tvoří hlavní část dusíkatých látek sušiny. Tyto proteiny můžeme v buňce nalézt ve formě apoenzymů. Součástí buněk kvasinek jsou také volné aminokyseliny, avšak množství je závislé hlavně na složení vnějšího prostředí. [7]

2.3.2 Sacharidy

Rozdělujeme dva typy sacharidů obsažené v buňkách kvasinek. Jedná se o sacharidy, které tvoří hlavní strukturu buněčné stěny glukan, manan a sacharidy vyskytující se v cytoplazmě, jedná se o dva hlavní polysacharidy glykogen a manan. Hlavní zásobní látku tvoří právě již zmiňovaný glykogen, který se skládá z molekul glukózy a vytváří se při nedostatečném množství uhlíku, fosforu, dusíku nebo síry. [7, 8]

2.3.3 Lipidy

Významnou součástí mitochondrií a buněčných membrán kvasinek jsou právě lipidy. Některé lipidy mají za úkol regulovat propustnost buněčné stěny. Jsou tvořeny především fosfolipidy, neutrálními lipidy a mastnými kyselinami. [9]

2.3.4 Minerální látky

Složení minerálních látek sušiny závisí na prostředí a stáří kvasinek. Největší procento je tvořeno fosforem, následně pak vápníkem a hořčíkem, které hrají důležitou roli při regulaci fermentace. Vápník zde hraje roli stimulantu rozmnožování kvasinek a rovněž zpomaluje jejich degradaci a degeneraci. Hlavní funkcí hořčíku je aktivace různých enzymů. Mezi další významné látky, které kvasinky obsahují, řadíme měď, železo, zinek, draslík, mangan, síru, křemík a sodík. [7, 9]

2.3.5 Organické látky

Mezi organické látky obsažené v kvasinkách řadíme vitamíny zejména skupiny B, jako je vitamín B1, B2, B6. V nízkých koncentracích je zde obsažen také vitamín A neboli β -karoten.

Kvasinky obsahují převážně ergosterol. Právě steroly tvoří důležitou složku kvasinek, mají za úkol zajišťovat konzistenci buněčných membrán a také jejich propustnosti. Další funkcí je podílení se na přenosu aminokyselin, pirimidinů a také na respiraci kvasinek. [3, 9]

2.4 Výživa kvasinek

Pro růst a rozmnožování potřebují kvasinky správnou výživu. Potřebné látky získávají ze svého živného prostředí, z živné půdy nebo živného média. Nutriční obsah živného prostředí, vytváří voda, zdroj uhlíku, dusíku, prvky důležité pro tvorbu živé hmoty jako je kyslík, vodík, fosfor a hořčík, vitamíny a růstové prvky, což jsou ovlivňující elementární složení biomasy kvasinek. Kvasinky přijímají výživu celým svým povrchem těla. Zdroj uhlíku a energie kvasinky dostávají z organických sloučenin, proto je řadíme mezi chemoorganotrofní organismy. Příjem živin kvasinek spočívá v přenosu látek pomocí pasivního a aktivního transportu. Pasivním transportem rozumíme tzv. usnadněnou difúzi, kde látka prochází membránou a putuje do prostředí ve směru koncentračního spádu pomocí přenašečů, které jsou zabudovány v membráně a nedochází tak ke spotřebě energie. Oproti tomu aktivní transport je spojen se spotřebou energie a je důležitý pro přenos anorganických iontů a prostých sloučenin, což jsou například sacharidy a aminokyseliny. Proteiny, které nesou anorganické ionty, nazýváme přenašeče. Bílkoviny, které nesou organické látky, označujeme jako permeázy. [9, 10]

2.4.1 Voda

Pro správný růst kvasinek je důležité, aby prostředí mělo dostatečnou vlhkost alespoň 30 % pro kvasinkovité formy a 20 % pro hyfovité formy. Voda tvoří buňku z 85 %, a vyskytuje se jak ve vázané, tak i volné formě. Vázaná voda umožňuje potřebné pučící účinky buňky pro její funkční strukturu, např. díky hydrataci polysacharidů, získává plazmatická membrána

a buněčná stěna dostatečnou pružnost a roztažnost. Volná voda tvoří v buňce transportní prostředek při látkové přeměně, zprostředkovává rozdělení meziproductů látkové přeměny a odvádí nadbytečné teplo. Snížením obsahu vody v buňce může být důsledkem disfunkce buněk a buňka se dostává do klidového stádia, ve kterém bez vykonávání jakýkoliv biologických funkcí může setrvat určitý čas. Pokud ovšem dochází ke stálému snižování přísunu vody, může to mít za následek desolvataci, vysrážení plazmatických koloidů a buňka odumírá. Jednotlivé organely obsahují různý obsah vody. Nejvíce vody obsahuje cytoplazmatická membrána naopak nejméně spory. [10]

2.4.2 Uhlík

Nejdůležitějším zdrojem uhlíku pro výživu kvasinek jsou především monosacharidy (glukóza, fruktóza aj.), disacharidy (sacharóza, maltóza aj.) případně oligosacharidy (maltotrióza, rafinóza). Mezi další zdroje uhlíku můžeme zařadit i další látky jako jsou glycerol, laktát ethanol, metanol, alkany, hydrolyzovaný tuk aj. [11]

Tabulka č. 2: Různé zdroje uhlíku pro růst kvasinek [5]

Zdroj uhlíku	Příklady zdrojů
Hexózy	Glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza
Pentózy	Arabinóza, xylóza, xylulóza
Disacharidy	Maltóza, sacharóza, laktóza, trehalóza, melibióza, celobióza
Trisacharidy	Rafinóza, maltotrióza
Polysacharidy	Škrob, inulin
Nižší alifatické alkoholy	Metanol, ethanol
Cukrové alkoholy	Glycerol, sorbitol
Organické kyseliny	Acetát, citrát, laktát, pyruvát

2.4.3 Dusík

Dusík tvoří další esenciální složku medií. Nejvýhodnějším zdrojem dusíku pro většinu kvasinek jsou amonné soli. Ovšem některé druhy kvasinek umí přijímat i vzdušný dusík, dusitany, dusičnany nebo jiné organické dusíkaté sloučeniny, jako jsou například aminokyseliny, peptidy nebo bílkoviny v hydrolyzované formě. Příjem peptidů je ovšem redukován jejich molekulovou velikostí. Vhodným zdrojem dusíku může být například močovina, síran amonný, kvasničný autolyzát. [12]

2.4.4 Kyslík

Kvasinky, řadíme mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, díky čemuž využívají sacharidy oxidačním či fermentačním způsobem. Kyslík hraje důležitou roli při biosyntéze sterolů a nenasycených mastných kyselin, a proto nemohou kvasinky dosáhnout požadované velikosti. Molekulární kyslík je potřebný pro syntézu nenasycených mastných esterů acyl-CoA. Kyslík tvoří důležitou složku pro dobrý růst kvasinek. [5]

2.4.5 Anorganické soli

Anorganické soli obsahují prvky důležité pro kvasinky, které dělíme na makroelementy, jako jsou Hořčík, Vápník, Draslík, Síra, Fosfor, Chlor a mikroelementy Kobalt, Bor, Kadmium, Měď, Molybden, Nikl, Chrom, Jod, Vanad. Sirné anorganické sloučeniny konkrétně sírany představují důležitý zdroj pro syntézu cysteinu methioninu a glutathionu. Mezi důležité prvky řadíme také fosfor, který se nachází v nukleových kyselinách, fosfolipidech a fosfomananech. [9]

2.5 Lipidy

Lipidy patří mezi základní biomolekuly, které jsou obsaženy v živých organismech. Tyto molekuly jsou nepolární, tudíž dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a špatně rozpustné ve vodě. Převaha nepolární struktury v molekule způsobuje, že lipidy mají olejovitou či voskovou strukturu. Jedná se o estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů. Jsou to lidskému tělu přirozené látky, které si umí samo vytvořit, ovšem výjimku tvoří esenciální mastné kyseliny nebo lipofilní vitamíny, které je nutné přijímat v potravě. Lipidy jsou důležitým stavebním prvkem biomembrán, řadí se mezi významné energie a slouží také jako izolátor pro uchování tepla. [13, 14]

2.5.1 Základní rozdělení lipidů

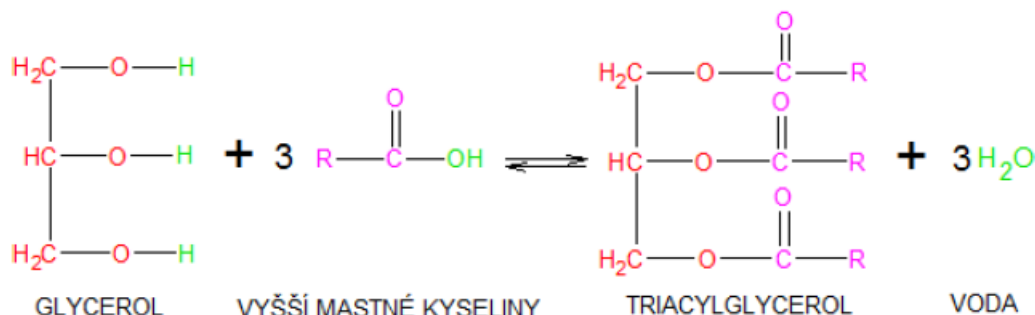
Jednoduché

Jednoduché lipidy rozdělujeme na acylglyceroly, které představují tuky oleje a vosky, jsou tím myšleny estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů. Rozdíl mezi tuky a oleji je v charakteru uhlíkového řetězce mastných kyselin. Tuky jsou tvořeny mastnými kyselinami, které mají pouze jednoduchou vazbu C-C. Oleje jsou tvořeny mastnými kyselinami obsahujícími nenasycený řetězec. Ve struktuře obsahují jednu či více dvojných vazeb, nacházejících se většinou v poloze „cis“. Díky těmto rozdílným strukturám se liší i jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Například oleje mají nízký bod tání způsobený existencí dvojných vazeb ve struktuře a jsou tekuté, zatímco tuky se nachází v pevném stavu i při pokojové teplotě. [13, 14]

Složené lipidy

Jedná se acylglyceroly, v jejichž struktuře je jedna z esterových vazeb esterifikována jinou kyselinou, například kyselinou fosforečnou. Na rozdíl od jednoduchých jsou na

molekulách složených lipidů vázány složky, především sacharidy a alkoholy, které způsobují jejich amfipatický charakter. Do této skupiny řadíme také fosfolipidy či glykolipidy. [13, 14]



Obrázek č. 2: Glycerol a obecná schéma mastných kyselin a triacylglycerolů

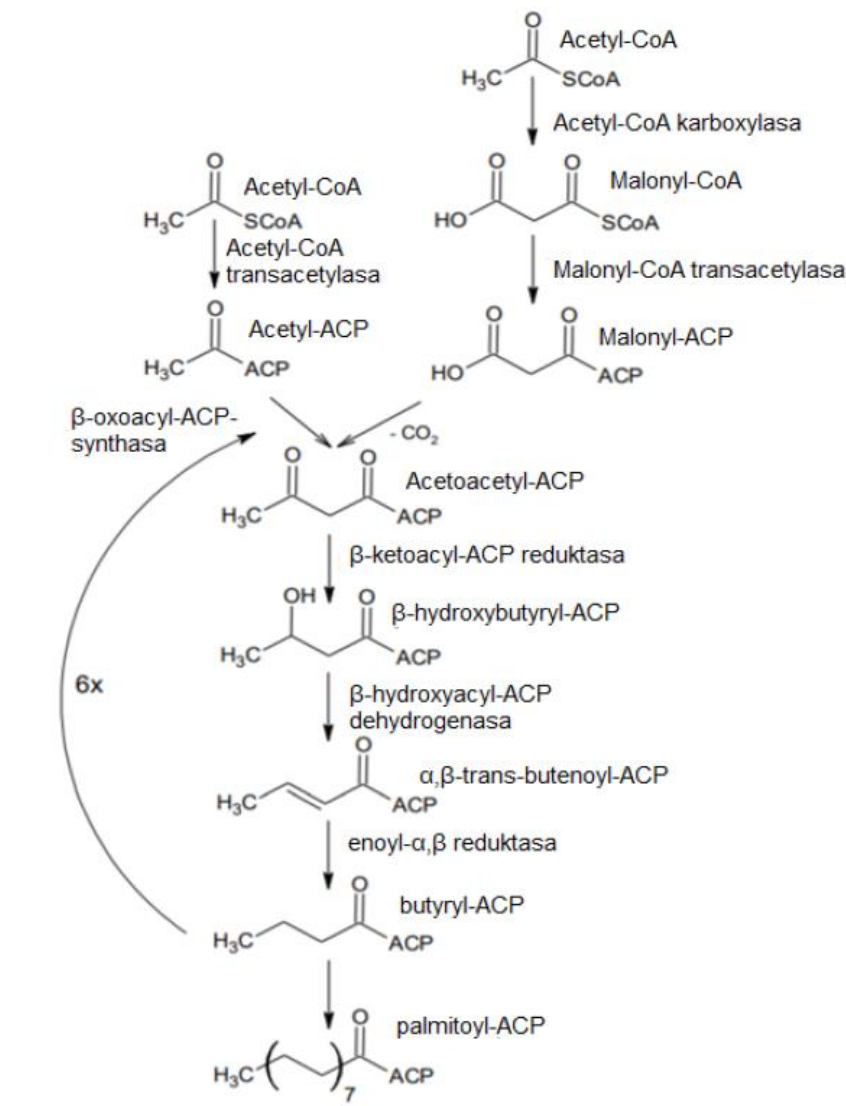
2.5.2 Produkce lipidů kvasinkami

Pro syntézu proteinů a nukleových kyselin je jako esenciální složka potřebný dusík. Dojde-li k vyčerpání veškerého dusíku, který byl obsažen v mediu, nastává zpomalení růstu organismu a dále neprobíhá syntéza proteinů a nukleových kyselin. V důsledku těchto podmínek dochází k nahromadění kyseliny citronové a citrát se následně aplikuje jako prekurzor pro tvorbu lipidů. Malá koncentrace dusíku má za následek zvýšení aktivity AMP-deaminasy, který má za úkol katalyzovat štěpení AMP za tvorby IMP a amoniaku, což způsobuje snížení koncentrace AMP v mitochondriích. AMP je aktivátor enzymu isocitrátdehydrogenázy, který štěpí dekarboxylaci isocitrátu. Jeho úbytkem nedochází k následnému metabolismu isocitrátu v Citrátové cyklu, ale dochází ke změně na citrát díky enzymu Akonitasa, který se hromadí v mitochondriích. Ten je následně přenesen do cytoplazmy, kde dochází k jeho štěpení na Acetyl-CoA a oxalacetát za katalýzy ATP-citrátlyázy. Tento proces vytváří zásobu acetyl-CoA, který je zásadní pro tvorbu lipidů. Pro syntézu lipidů je důležitý i dostatek NADPH, které se využívá jako redukční činidlo tvořené dekarboxylací malátu vzniklého z oxalacetátu za vzniku pyruvátu. Takto vzniklé lipidy mají unikátní kompozici mastných kyselin a skládají se převážně z triacylglycerolů. [5, 15, 16, 17, 18]

2.5.3 Metabolismus Lipidů

Biosyntéza mastných kyselin se odvíjí od acetyl-CoA. Prvotní molekula acetyl-CoA je enzymem acetyl-CoA-transacetylase transformována na acetyl-ACP a následně navázána na cysteinový zbytek enzymatického komplexu syntézy mastných kyselin za uvolnění ACP. Druhý řetězec molekuly acetyl-CoA je prodloužen působením enzymu acetyl-CoA karboxylasy o jeden atom C za vzniku malonyl-CoA, a dále upravena na malonyl-ACP. Malonyl-ACP je následně modifikován konjugčním enzymem na komplexu syntézy mastných kyselin obsahující i acetylový zbytek. Další dekarboxylaci a kondenzaci dochází působením β -oxoacyl-ACPsyntasy k tvorbě acetoacetyl-ACP. Poté je na komplexu mastných kyselin acetoacetyl-ACP pozměněn řadou enzymatických reakcí obsahující redukci oxo-skupiny enzymem β -ketoacyl-ACP-reduktasa na β -hydroxybutyrylACP. Katalyzovanou dehydratací β -hydroxyacyl-dehydrogenasou se tvoří α,β -trans-butenoyl-ACP. Poslední částí je redukce enoyl- α,β -reduktasou za tvorby konečného produktu butyryl-ACP. Tímto způsobem je uhlíkatý skelet

acetyl-CoA prodloužen celkem o dva uhlíky. Pokud je tento mechanismus opakován celkem 6krát, dochází k syntéze 16 uhlíkového řetězce kyseliny palmitové. [13, 14]

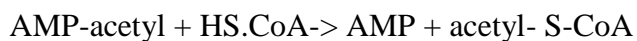


Obrázek č. 3: Schéma biosyntézy mastných kyselin [13]

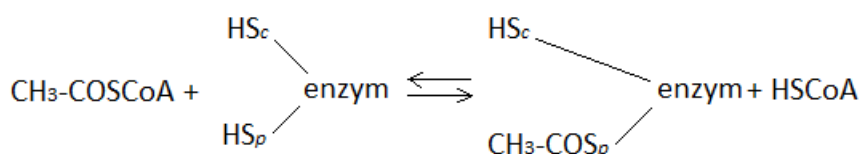
2.5.4 Vnitrobuněčné lipidy

Neutrální lipidy kvasinek jsou sloučeniny glycerolu a nasycených či nenasycených mastných kyselin. V kapalném prostředí kvasinek dochází k přeměně sacharidů na tuky. Tuk v kvasinkách je v kapalném skupenství. Lipidy kvasinek se vyskytují ve formě kapiček, které jsou rozptýleny ve vakuolách nebo ve funkčních strukturách. Jejich výskyt má mnohé využití jako je např. zásoba energie s vysokou energetickou hodnotou nebo se mohou využívat v metabolických procesech spolu s jinými látkami jako přenašeč aj. Bylo zjištěno, že kvasinky obsahující kolem 2-3 % tuku mohou vlivem stárnutí, působením kyslíku a výživy zvýšit jejich obsah až na 20 %. Pro stavbu lipidů jsou potřebné mastné kyseliny, které vznikají v buňce kondenzací acetylových jednotek. Hlavním faktorem této přeměny je koenzym A, což je biokatalyzátor velkého množství reakcí, jejímž centrem je kyselina octová. Volná kyselina

octová se v kvasinkách nevyskytuje, objevuje se zde pouze ve formě acetylderivátu. CoA se nejdříve aktivuje na trioester, k tomuto procesu se spotřebuje energie z ATP, které se postupně rozpadá na AMP a PP (pyrofosfát). Díky tomu je trvale udržována tvorba ve směru aktivovaného Ac-S-CoA.



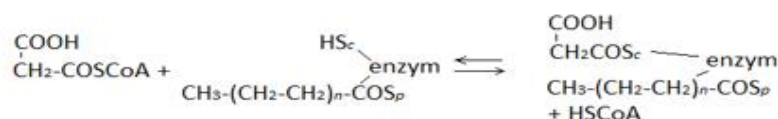
Donorem reakcí je látka obsahující dvojuhlíkovou jednotku jako je např. acetylfosfát. Akceptorem dvojuhlíkové jednotky jsou látky jako např. cholin, histamin, hydroxylamin aj. První reakcí je přenos acetylové jednotky.



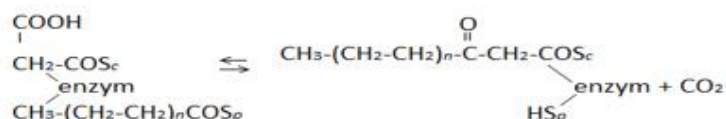
Obrázek č. 4: Přenos acetylové jednotky [19]

Důležitou vlastností daného biosyntetického procesu je, že všechny intermediáty jsou prostřednictvím síry kovalentně vázány na bílkovinu. Rozlišujeme dva typy sulfohydrylových skupin, které se označují jako centrální HSc a jako periferní HSp.

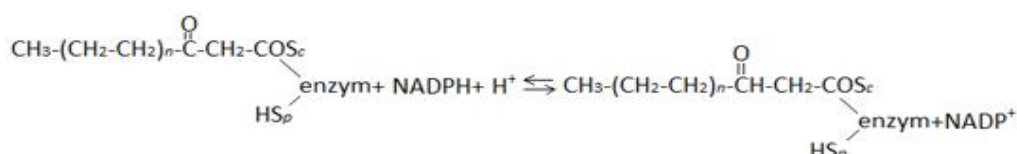
- Přenos malonylové jednotky



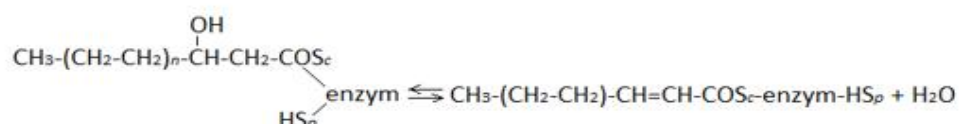
- Kondenzace



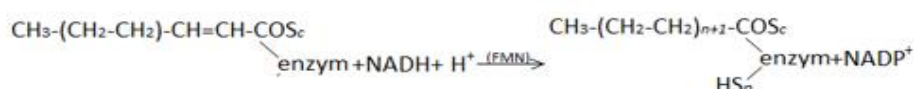
- První redukce



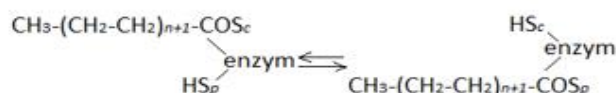
- Dehydratace



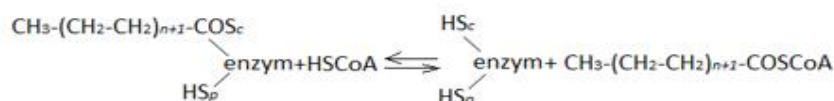
- Druhá redukce



- Přenos acylu



- Zakončující reakce



Obrázek č. 5: Reakce prodlužující řetězec karboxylových kyselin [19]

Při tomto procesu se uplatňují dva enzymové systémy: acetyl-CoA-karboxyláza a syntetáza karboxylových kyselin. Acetyl-CoA-karboxyláza patří do skupiny biotinových enzymů díky její prostetické skupině, kterou tvoří biotiny. Nejprve musí dojít k vytvoření N-karboxy-biotinylový intermediát. Donorem karboxylu je bikarbonát a energie potřebná na novou vazbu mezi uhlíkem a dusíkem se získává z ATP. Následuje přenos karboxylové skupiny na akceptor Ac-CoA. [19]

2.5.5 Fosfolipy

Kromě tuků jsou v kvasinkách obsaženy také fosfolipidy. Jsou to látky, které ve své molekule obsahují mimo jiné jednu alkoholovou skupinu glycerolu, esterifikovanou kyselinou fosforečnou a na ni vázanou dusíkatou složku, jako je například u lecitinu cholin, ethanolamin v kefalinu apod. Fosfolipidy představují velmi důležité složky buněčných membrán, ve kterých jsou jejich molekuly volně spojeny, takže usnadňují propustnost a pružnost membrán. Celkový obsah lipidů a fosfolipidů je závislý na složení živného média a podmínkách kultivace. Velké množství lipidů kvasinky hromadí v případě obsahu *n*-alkanech v médiu. [20]

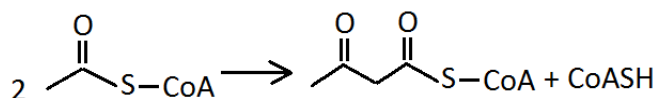
2.5.6 Mimobuněčné lipidy

Kvasinky mohou produkovat lipidy také do prostředí mimo jejich buňky. Tuto vlastnost mají především kvasinky vyskytující se na listech rostlin, jako jsou např. *Torulopsis*, *Rhodotorrula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hansenula*, *Sporobolomyces* aj. Dnes známe celkem čtyři typy extracelulárních lipidů:

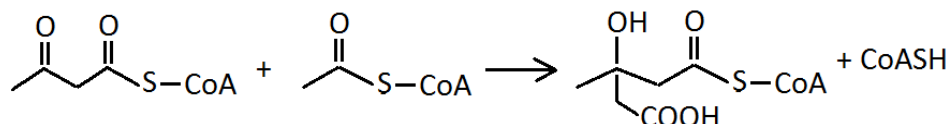
- a) estery polyolů a karboxylových kyselin ve kterých se nasycené, nenasycené a hydroxykarboxylové kyseliny spojují esterovou vazbou s polyoly s 5 a 6 uhlíky,
- b) sofozidy hydroxykarboxylových kyselin, ve kterých jsou nasycené a nenasycené karboxylové hydroxykyseliny vázané glykosidovou vazbou na disacharid soforózu,
- c) acetylované sfingoziny, které jsou hydroxyskupiny a aminoskupiny C₁₈-fytosfingozinu a C₁₈-dihydrosfingozinu acetylované,
- d) C₂₂-kyseliny, kde dochází k acetylaci karboxylových trihydroxykyselin a dihydroxykyselin. [19]

2.6 Steroly a karotenoidy

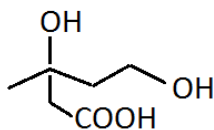
Molekuly sterolů a karotenoidů vznikají kondenzací acetyl-CoA až po kyselinu mevalonovou.



Acetoacetyl-CoA se dále kodenzuje s novou molekulou



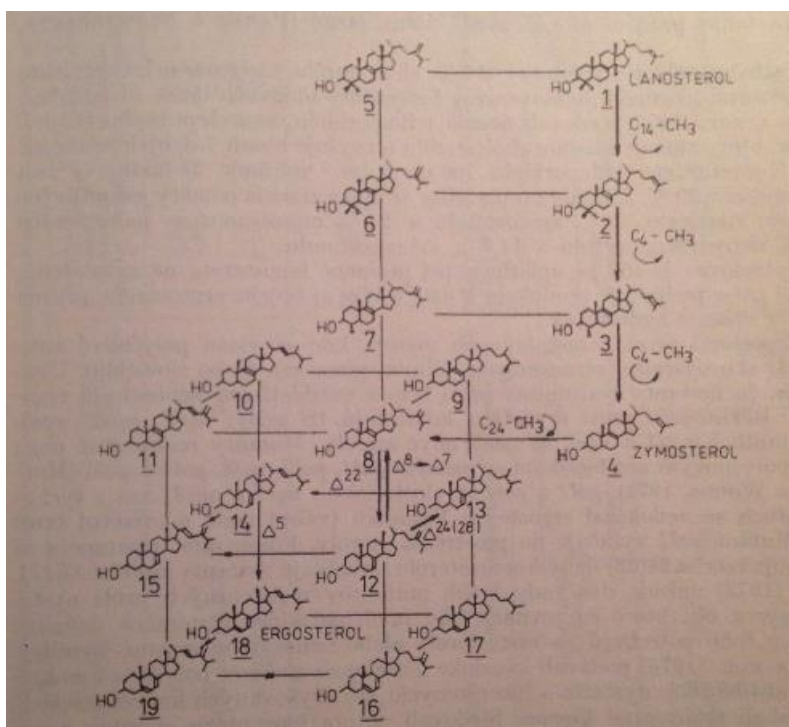
Produkt této reakce umožňuje tvorbu kyseliny mevalonové



Dekarboxylací a vytvořením dvojité vazby vzniká izopentenylpyrofosfát, který je společným prekurzorem sterolů a karotenoidů. [19]

2.6.1 Steroly

Mezi hlavní zástupce sterolů patří ergosterol. Obsah sterolů není závislý pouze na druhu kvasinek, ale také na podmínkách jejich kultivace. Steroly se nachází hlavně ve vnitrobuněčných membránách, proto jejich stanovení je závislé na tom, zda máme preparát ve formě intaktní vlhké kvasinky, zlyofilizované nebo jiným způsobem konzervované formě. V kvasinkách dochází k esterifikaci sterolů převážně nenasycenými mastnými kyselinami s C₁₆ a C₁₈, hlavně kyselinou olejovou a palmitovou. V exponenciální fázi růstu je hladina esterifikovaných sterolů stálá a začíná vzrůstat, až do doby, kdy kultura přechází do stacionární fáze. V tomto bodě dochází, k navýšení esterifikovaných sterolů oproti tomu obsah ergosterolu se snižuje. Ergosterol tvoří jejich prekurzor a nemohou se tak dále methylovat.



Obrázek č. 6: Všeobecný model biosyntézy sterolů *Torulopsis glabrata* [19]

Ergosterol a kyselina olejová se považují za faktory, které pomáhají v přežití kvasinek např. při výrobě vína nebo při uchování kultur ve sbírkách. [19]

2.6.2 Karotenoidy

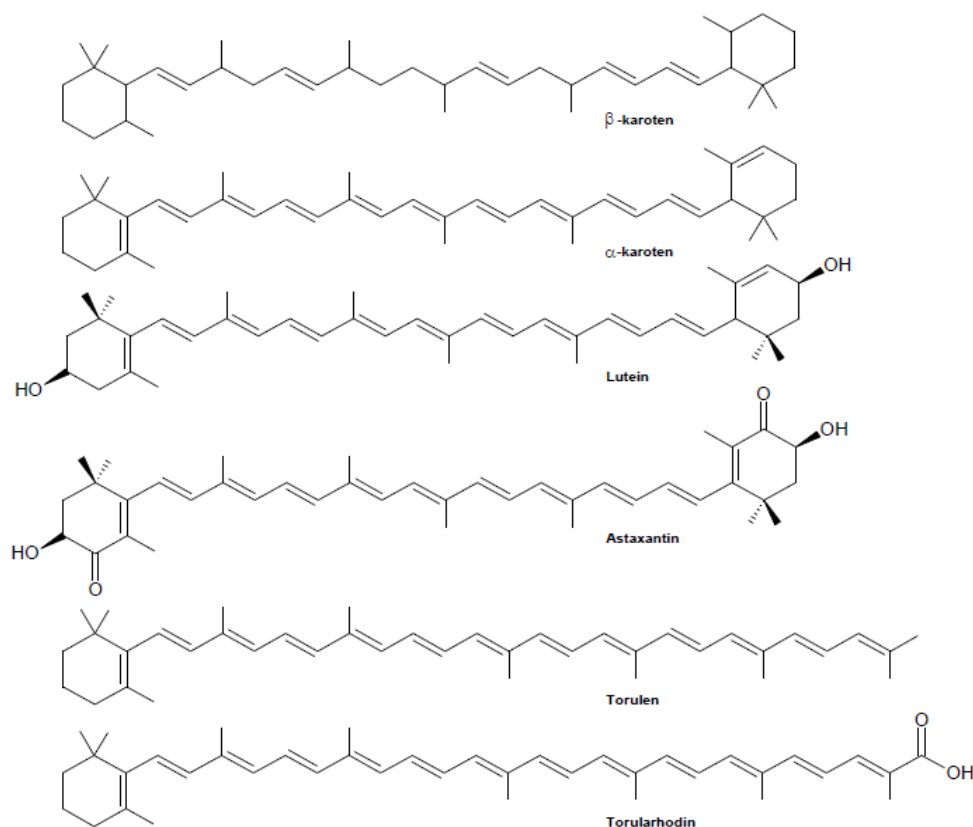
Některé kvasinky jsou schopné vytvářet ve svém buňkách karotenoidní barvivo. Tímto barvivem vybarvují svoji kulturu na cihlově červenou, žlutou, oranžovou nebo světlehnědou barvu. Výskyt karotenoidních pigmentů v buňkách mikroorganismů patří k systematickému zařazení do skupiny. Zástupci těchto skupin řadíme do čeledi *Rhodotorulaceae* a *Sporobolomycetaceae*. Karotenoidní barvivo je rozpuštěno v buňkách ve formě tukových kapének. Začínají se vytvářet na konci exponenciální fáze růstu a jsou závislé na přítomnosti světla. Mezi účinný akceptor světla patří flavin nebo flavoprotein, který je schopen fotooxidace. Oxidačním produktem je enzym, který je součástí procesu karotenogeneze. Barevný odstín karotenoidu záleží na poměru jednotlivých intermediátů, které se v kvasinkách nachází. Také zásadní roli hrají kultivační podmínky. Vytvoření karotenoidů se objasňuje jako ochranná reakce proti škodlivému ultrafialovému záření. [19, 20]

Karotenoidy řadíme do dvou skupin:

- a) Anoxygenní uhlovodíky: Karoteny,
- b) Oxygenní deriváty: Xantofyly, ketony, kyseliny a epoxidy.

Nejpočetnější skupinu známých karotenoidů, tvoří skupina oxygenních derivátů, které vznikají jako oxidační produkty anoxygenních tetraterpenů. Rozmanitost jednotlivých struktur je dána zakončením řetězce, vytvářejícího 9 uhlíkových atomů, díky čemuž můžeme karotenoidy rozdělit do tří skupin. [21, 22, 23]

- Acyklické
 - zakončení je tvořeno lineárním řetězcem,
 - př. β -karoten, lykopen, neurosporen.
- Monocylické
 - jeden konec řetězce vytváří pětičlenný či šestičlenný cyklus,
 - př. torulen, tolularhodin, γ -karoten.
- Bicylické
 - oba konce jsou zakončeny cyklicky,
 - β -karoten.



Obrázek č. 7: Struktura vybraných karotenoidů [24]

2.7 Oleogenní kvasinky

Oleogenní kvasinky jsou slibnými kandidáty na výrobu obnovitelných biopaliv jako je např. transesterifikovaná nafta, oleochemikálie na bázi mastných kyselin, které mohou být aplikovány jako maziva a doplňky v potravinářském, zemědělském a kosmetickém průmyslu. Mezi oleogenní kvasinky řadíme rody *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorola*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Lipomyces*. Tyto mikroorganismy mohou konzumovat fermentovatelné cukry a převádět je na lipidy. Uvedené lipidy jsou většinou triacylglyceroly nebo volné mastné kyseliny. Mikrobiální lipidy obsahující esenciální mastné kyseliny, jako je kyselina linolová, kyselina arachidonová a kyselina dokosaheptaenová, jsou zvláště cenné v potravinářském, chemickém a farmaceutickém průmyslu. Rovněž lipidy s mastnými kyselinami jsou v rozmezí od C₁₀ do C₁₈ atraktivní surovinou pro výrobu obnovitelných paliv, například bionafty. Především díky nízkému podílu uhlíku a nízkému obsahu síry jsou emise oxidu uhelnatého a uhlovodíků ve srovnání s fosilními palivy nižší. V olejnatých kvasinkách je produktivita lipidů obecně zlepšena použitím dávkovým a kontinuálním způsobem kultivace za různých podmínek omezující živiny, jako je dusík, fosfor nebo železo. Bylo zjištěno, že omezení dusíku má výrazný vliv na akumulaci lipidů v kvasinkách, zejména kvůli posunu v jeho metabolickém toku, který vede k zastavení buněčného růstu a spouští akumulaci lipidů. Olejnaté plísně produkují více nenasycených složek než kvasinky, díky tomu jsou využity k produkci polynenasycených mastných kyselin v lékařství a v potravinářství. Jsou jimi např. kyselina γ-linolenová, kyselina arachidonová nebo kyselina dokosaheptaenová. Geneticky

modifikované kvasinky se schopností přenášet funkční mastné kyseliny do skladovacích lipidů jsou před vláknitými houbami výhodnější díky jejich komerční produkci. [6, 25]

2.7.1 Kvasinky rodu *Rhodosporidium*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* představují haploidní stádium v životním cyklu rodu *Rhodosporidium*. Vyznačují se tím, že jsou lipidotvorné, tuk je hromaděn v buňkách kvasinek. Biomasa po extrakci lipidů může být zdrojem proteinů hodnotného pro výživu a obsah základních aminokyselin. [1]

2.7.1.1 *Rhodosporidium toruloides*

Rhodosporidium toruloides je oleogenní kvasinka, která je schopná akumulovat až 70 % své suché biomasy ve formě lipidů. Během logaritmické a stacionární fáze mohou produkovat až 100g l^{-1} biomasy. Jako zdroj uhlíku využívá C_5 a C_6 cukry, které jsou přítomny v hydrolyzátech z různých lignocelulóзовých biomas. Tento mikroorganismus může být využit například pro valorizaci zbytků z lesnictví a jsou díky němu získávány produkty s vyšší přidanou hodnotou. Mastné kyseliny přítomné v lipidech akumulovaných tímto druhem jsou hlavně kyselina palmitová, stearová, olejová a linolová. Spolu s výrobou lipidů produkují tyto kvasinky karotenoidy jako je β -karoten, torulen, torularhodin. Produkce specifických mastných kyselin jako jsou neutrální lipidy, glykolipidy, sfingolipidy nebo fosfolipidy je dosaženo přidáním různých druhů minerálních solí, jako jsou NH_4Cl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a CaCl_2 .

Anamorfní formou tohoto druhu je *Rhodotorula kratochvilovae*. Obsahuje haploidní kulovité nebo elipsoidní buňky. Haploidní kultura má oranžovou nebo růžovou barvu. *R. toruloides* je heterotalický i homotalický druh. V heterotalické fázi se rozlišují na dvě pohlaví, kde do 24 h dochází ke konjugaci a nastává jejich plazmogamie. [1, 25]



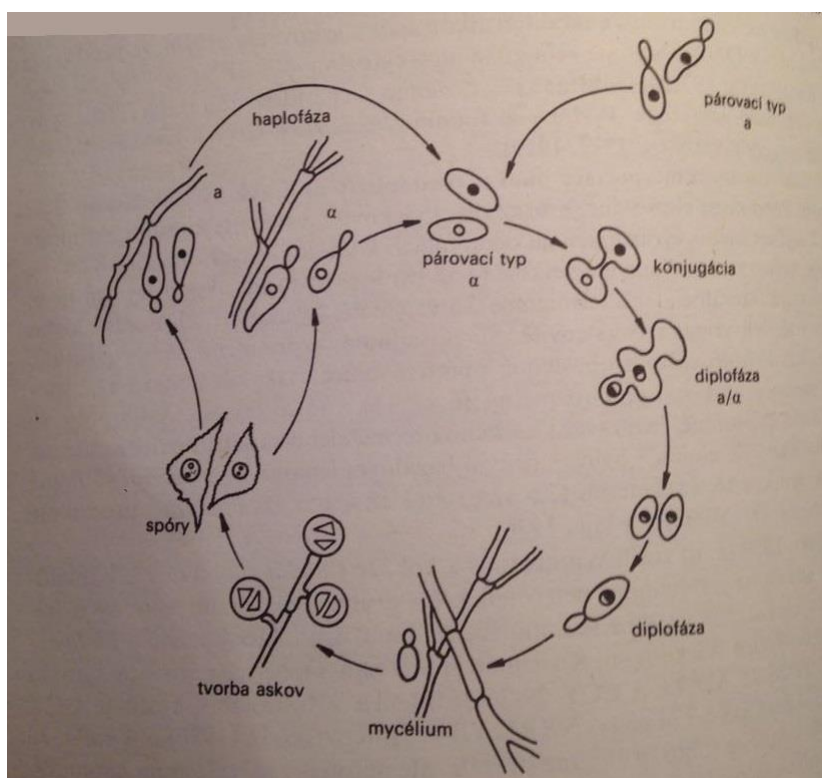
Obrázek č. 8: *Rhodosporidium toruloides* na petriho misce

2.7.2 Kvasinky rodu *Yarrowia*

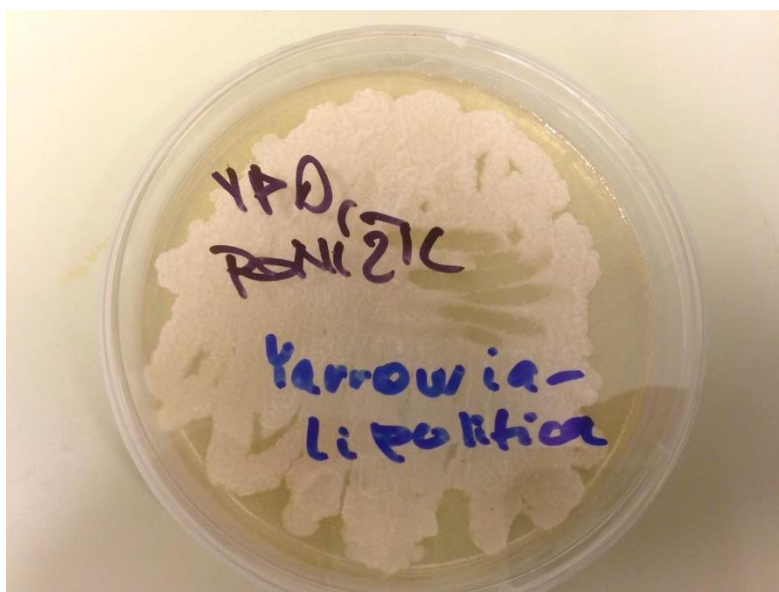
Kvasinky rodu *Yarrowia* byly vytvořeny v roce 1980 van der Waltem a Von Arx na základě anamorfního druhu *Candida lipolytica*. Rod *Yarrowia* obsahuje pučící buňky, pseudohyfy a pravé hyfy s šířkou 2 až 4 μm . Vytváří elipsoidní, hruškovité a válcovité konidie, které jsou přilnuté k hyfám nebo vyrůstají na dentikulách konidiogenních buňkách. Konidie mají velmi zřetelnou jizvu o velikosti 4 až 18 μm x 3 až 6 μm . Asky jsou jednotlivé a vyrůstají laterálně nebo terminálně, mají vejcovitý, elipsoidní kulovitý a jen zřídka válcovitý tvar. Asky obsahují jeden až dvě v některých případech i 4 spory. [1]

2.7.2.1 *Yarrowia lipolytica*

Candida lipolytica představuje haploidní anamorfní stádium heterotalického druhu. Párováním vhodným haploidním kmenem vzniká teleomorfní stádium a druh, který je označován *Yarrowia lipolytica*, je schopen akumulovat až 40 % své suché hmotnosti v lipidech. Eikosapentaenová kyselina syntetizovaná z kvasinky druhu *Yarrowia lipolytica* je slibným zdrojem pro výrobu mnoha důležitých speciálních tuků, jako je kakaové a bambucké máslo. Schopnost těchto mikroorganismů syntetizovat vysoký obsah kyseliny stearové byla již dříve využita, protože v potravinářském průmyslu byly využívány v 80. letech 20. století jako ekvivalent kakaového másla. [1, 6, 26]



Obrázek č. 9: Životní cyklus *Yarrowia lipolytica* [1]



Obrázek č. 10: *Yarrowia lipolytica* na petriho misce

2.7.3 Kvasinky rodu *Metschnikowia*

Rod *Metschnikowia* řadíme do čeledi *Metschnikowiaceae*. Tato čeleď je charakterizována vegetativním rozmnožováním. Pseudomycelium je jen rudimentální a velmi často se ani nevytváří. Aský jsou protáhlé a pálkovitě zakončené a tato část má kulovitý či elipsoidní tvar. V asku je obsažena jedna nebo dvě spory. Askospory jsou jehlicovitého tvaru na jednom konci nebo na obou koncích vytváří hroty. Díky tvorbě askospor jsou kvasinky rodu *Metschnikowia* řazeny do oddělení *Ascomycotina*. Mnoho druhů vytváří heterotalické kmeny, což znamená tvorbu pohlavně rozšířených kmenů, kde dochází ke kopulaci buněk jednoho kopulačního typu s buňkami opačného kopulačního typu. Tyto kvasinky mají většinou kulatý, elipsoidní či hruškovitý tvar buněk. Kvasinky rodu *Metschnikowia* jsou v přírodě poměrně rozšířené. Je známo více než 35 druhů tohoto rodu, které byly nalezeny na květech, ovoci, tělech bezobratlých živočichů, hmyzu nebo na kůži člověka. Některé druhy jsou parazité, parazitující na bezobratlých živočiších. Mohou se také vyskytovat volně ve vodě nebo v půdě. Podle přirozeného výskytu rozdělujeme kvasinky rodu *Metschnikowia* na:

- a) vodní, akvatické druhy,
- b) pozemní, terestrické druhy.

Extrakt z buněčných stěn kvasinek rodu *M. agaves* a *M. hawaiiensis* je přidáván do kosmetických přípravků, kde prokazatelně snižuje stárnutí pleti. Do tohoto rodu řadíme i patogenní kvasinky například *M. ipomoeae*, které jsou patogeny rostlin nebo *M. bicuspidata* parazitujících na krevetách. [1, 3, 27, 28]

2.7.3.1 *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima tvoří kulovité nebo elipsoidní vegetativní buňky. Po určité době růstu, dochází u tohoto druhu k tvorbě kulovité chlamydospory s velkou kapsou olejovité refraktilní látky, která se nazývá *pulcherrimae*. Jejich poznávacím znakem, je v případě barvení skličkovité kultury, že chlamydospory nepřijímají barvivo a v koloniích zůstávají prázdná

nevybarvená místa. V kulturách, které jsou izolovány z přírody, se z chlamydospor vytváří pálkovité asky s jednou až dvěma jehlicovitými spory. Ve zralosti dochází k prasknutí asků na vrcholu a uvolňují se spory. Vhodnými podmínkami pro kultivaci těchto kvasinek je teplota 24°C a pH=5. Pro konjugaci je potřebný zdroj glukózy, Na²⁺ stimuluje aglutinaci a Mg²⁺ stimuluje pouze konjugaci. [1]

2.8 Růst kvasinek

Dle potřeby kyslíku k růstu kvasinky je dělíme na dvě skupiny. Některé kvasinky jsou aerobní a vyžadují ke svému růstu kyslík ve velkém množství. Jiné jsou fakultativně anaerobní a dobře rostou v médiích obsahujících malou koncentraci rozpuštěného kyslíku. Při vytvoření striktně anaerobních podmínek se může stát, že některé kvasinky se stávají auxotrofní na ergosterol a kyselinu olejovou. Rychlost růstu kvasinek a jejich fyziologické vlastnosti jsou závislé na kultivaci, především na obsahu živin v produkčním médiu, charakteru živin a fyzikálních podmínkách. Submerzní kultivační metoda může být buďto homogenní nebo heterogenní a podle toho, zda růst mikroorganismů probíhá volně v tekutém mediu nebo na nosičích vložených do fermentačních tanků, můžeme hovořit o dialyzované struktuře. [10]

2.8.1 Jednorázová kultivace

Pod tímto pojmem je možné si představit kultivaci kvasinek, kde do celého objemu sterilního živného prostředí o určitém počátečním složení bylo zaočkováno určité množství mikroorganismu za konstantní teploty, pH, vzdušnosti apod. Následně kultivace probíhá do té doby, než dojde v důsledku vyčerpání živin nebo nahromadění toxických metabolitů k zastavení růstu či množení. Tato metoda kultivace má svou charakteristickou kinetiku růstu s různými fázemi. Důležité je, že v jednorázovém systému není nikdy konstantní ani během logaritmické fáze, kdy je konstantní rychlost růstu. To je příčinou řady změn v buňkách kvasinek a dochází jak k její enzymatické změně, tak i změně složení makromolekul a cytologie buňky. [10]

2.8.2 Kultivace přítoková

V případě přítokové kultivace dochází na počátku k vložení inokula do kultivační nádoby v takovém množství, které odpovídá potřebné kultivační době při volené růstové rychlosti. Médium zde může přitékat lineárně či exponenciálně případně jiným způsobem podle typu procesu. [10]

2.8.3 Kultivace kvasinek v baňkách na třepacích stojích

Většina kultivací kvasinek probíhá za aerobních podmínek, tato metoda kultivace je řešena prostřednictvím třepacích strojů. Důležitou charakteristikou uvedené kultivace je růst kvasinek v suspenzi, kde mikroorganismy mohou volně využívat substrát. Pro kultivaci na třepacích strojích jsou navrženy různé nádoby například baňky se čtvercovým dnem, ovšem nejčastěji jsou využívány erlenmeyerovy baňky. Zásadním faktorem je zde také uzavěr baňek, pomocí kterého dochází k difuzi plynu. Nejčastěji se využívají vatové uzavěry, mohou být však využity také filtrační disky či jiné obaly. [10]

2.8.4 Fáze rozmnožování

Kvasinky se rozmnožují základními způsoby, jakou jsou multipolární a bipolární pučení, dělením a terminálním růstem. Pro určení hmotnosti či počtu buněk získáváme hodnoty, které jsou vynášeny v závislosti na čase a dostáváme tak růstovou křivku. Pokud jsou kvasinky kultivovány jednorázovou metodou, prochází vývojem několika fází: 1. lag fáze, 2. fáze zrychlení, 3. exponenciální fáze, 4. fáze zpomalení, 5. stacionární fáze, 6. fáze odumírání. Během lag fáze dochází k přibývání buněčné hmoty a neprobíhá zde dělení. Velikosti buněk kvasinek, do které dorostou, jsou ovlivněny mnoha faktory, mezi které řadíme například genetický faktor a vliv prostředí. Hmotnost kultury se tedy zvyšuje především růstem dceřiných buněk. V případě, že je dusík přítomen pouze v limitovaném množství a je zde nedostatek uhlíku, může při kultivaci dojít k tomu, že pučí jen některé frakce mateřských buněk a vytváří se dceřiné buňky, které dosahují kultivaci frekvence více než 80 %. Celková délka lag fáze závisí na druhu kvasinek složení a vlastnostech předcházejícího a nového média.

Druhou fází je fáze růstu neboli zrychlení, kdy dochází k urychlení všech buněčných syntéz, navýšení obsahu buněčných látek, například RNA a zvětšení buněk, dokud všechny parametry zvláště ty kinetické nedosáhnou maximálních hodnot. Následuje fáze exponenciální. Dokud buňky rostou exponenciálně jejich specifická růstová rychlost je stálá a má maximální hodnotu, která není závislá na koncentraci substrátu. V této části nedochází ke změně chemickému složení buněk. Čas, po který buňky nemění své vlastnosti, bývá velmi krátký, a to hlavně díky změně koncentrace živin. V některých případech může dojít k navýšení množství koncového produktu, až dojde k překročení mezních koncentrací živin a produktů. Následkem těchto změn je snížení rychlosti veškerých syntéz buněčných látek, snížení koncentrace látek v buňkách i velikost buněk samotných, což představuje další fázi vývoje. Pokud dojde k tomu, že účinná koncentrace živin klesne na tak nízkou hodnotu, že rychlost růstu se postupně blíží nule, nastává fáze stacionární. V poslední fázi dochází k odumírání buněk mikroorganismů. Díky mnoha experimentům je dokázáno, že změna složení a vlastností buněk má na svědomí právě jednorázový způsob kultivace. Díky tomuto způsobu dochází k plynulé změně růstového prostředí a vlastnosti buněk a zároveň dochází k fyziologické změně buněk. Nejmenší změny probíhají během lag fáze. [10]

2.9 Biochemie kvasinek

Buňky kvasinek potřebují pro svůj vývoj a růst látky rozpustné ve vodě, které využívají pro stavbu své živé hmoty. Tyto látky jsou rozkládány na produkty, které jsou využívány pro syntézu protoplazmatické bílkoviny, glycidů, tuků, fosfátů a jiných látek vytvářející živou hmotu buněk kvasinek. Podle Justa je jedna buňka kvasinky schopna zpracovat při kvašení $\frac{1}{4}$ živých látek svojí váhy za den. Kvasinky jako zdroj energie využívají mechanickou, elektrickou nebo světelnou energii. Například tepelná energie má vliv pouze na lepší energetické hospodaření a nemá vliv na růst a vývoj. Chemická energie je využívána pouze v případě jejího uvolňování v buňce, je získávána z látek, které se do buňky dostávají skrz buněčnou stěnu. Buňky si vytvářejí složité bílkoviny tzv. enzymy. Ty mají za úkol katalyzovat bílkovinné procesy, díky tomu je nazýváme biokatalyzátory. Látky, které reagují v daném procesu, se musí převést do aktivovaného stavu, což nastává díky aktivační energii. [20]

2.9.1 Stanovení Lipidů

Největší podíl lipidů v buňkách kvasinek se nachází v plazmatické membráně a v membránách buněčných organel. Dále se mohou nacházet také v buněčné stěně. V případě kultivace v balancovaném mediu je obsah lipidů v sušině kvasinek kolem 5–15 %. Existují ovšem některé druhy kvasinek, které mají obsah tuků v sušině až 60 %. Buněčná stěna kvasinek představuje důležitou bariéru pro malé molekuly lipidů, z tohoto důvodu představuje extrakce dezintegrovaných buněk větší výtěžnost lipidů než extrakce intaktních buněk neutrálními rozpouštědly. [10]

2.9.2 Mechanismus využití dusíkatých sloučenin

Po přeměně uhlíkatých látek v buňkách kvasinek jsou důležité také přeměny dusíkatých látek. Transformace obou těchto látek tvoří nejzákladnější úseky celého metabolismu a zároveň jedna bez druhé nemůže reagovat. Kvasinky při přijímání látek dávají přednost jednoduchým sloučeninám dusíku. Velké molekuly bílkovin musí být nejdříve rozloženy na aminokyseliny, aby mohly tyto látky difundovat do nitra buňky. Následně si kvasinka vybírá dusíkaté látky z přirozené směsi, přičemž dává přednost jednoduchým anorganickým látkám ve formě amonných solí jako je např. fosforečnan nebo síran amonný. Bylo zjištěno, že podmínkou rozmnožování kvasinek je, že na jeden díl celkového dusíku potřebují 1,5 až 2,9 dílu stravitelného dusíku v prostředí. Ukázalo se, že čím je cukr hůře asimilovatelný, tím více vzrůstá požadovaný poměr cukru k celkovému dusíku. Tento poměr vzrůstá i se zvyšováním koncentrace cukru v prostředí. O optimálním množství dusíku můžeme hovořit pouze v souvislosti s obsahem využitého cukru. Při nedostatku dusíku v prostředí dojde k porušení celkového metabolismu, ovšem oxidace cukru je ovlivněna méně než jeho kvašení. Z toho vyplývá, že jde o dva odlišné mechanismy. Poté co dojde k přeměně fosforylované triózy za katalytické účasti dehydrogenázy, je glykolýza zastavena, zatímco respirace pokračuje dále. Respirace probíhá pomocí přeměny glukózy-6-fosfát na kyselinu 6-fosfoglukonovou. Dále bylo zjištěno, že při nedostatku dusíku je podporována syntéza acetyl CoA a mastných kyselin, což má za následek zvýšení tvorby tuků. Při nedostatku dusíku v prostředí dojde k porušení celkového metabolismu, ovšem oxidace cukru je ovlivněna méně než jeho kvašení. Z toho vyplývá, že jde o dva odlišné mechanismy. Respirace jde cestou přes přeměnu glukóza-6-fosfát na kyselinu 6-fosfoglukonovou. [20]

3 Cíl práce

Cílem této práce je srovnat produkci lipidů rozdílnými kvasinkovými kmeny, zhodnotit jejich složení a možné aplikace. V bakalářské práci budou řešeny následující dílčí úkoly:

- Přehledná literární rešerše zaměřená na srovnání metabolismu kvasinek rodu *Metschnikowia*, *Yarrowia* a *Rhodospiridium*
- Optimalizace složení produkčních médií s využitím nutričního stresu
- Srovnání produkce biomasy, lipidů a složení mastných kyselin jednotlivými kmeny

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s r.o. (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)
Chlorid sodný p.a., Penta (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran hořečnatý anhydrid p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Glycerol anhydrid p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Močovina p.a., Penta (ČR)
Hydroxid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Pepton z kaseinu, Roth (SRN)
Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)
Hydrogenfosforečnan sodný p.a., Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)
Odpadní tuk, Norilia (Norsko)
Odpadní peří, LINA, s.r.o. (Kroměříž)

4.1.2 Chemikálie použité pro HPLC

Methanol pro HPLC, VWR International S.A.S.
Acetonitril pro HPLC, VWR International S.A.S.
Chloroform pro HPLC, VWR International S.A.S.
Ethyl acetát pro HPLC, VWR International S.A.S.

4.1.3 Chemikálie použité pro extrakce a transesterifikace

Aceton p.a., Lach-ner s r.o. (ČR)
Kyselina sírová 96%, Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Methanol pro HPLC, VWR International S.A.S.

4.2 Použité kvasinky

Rhodospiridium toruloides CCY 062-002-004

Yarrowia lipolytica CCY 29-26-4

Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-147

Metschnikowia chrysoperlae CBS 9803-11-1158

4.3 Přístroje a pomůcky

Centrifuga BioTech, (ČR)

Analytické váhy Boeco (SRN)

HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
 - Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
 - Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
 - Vyhodnocovací systém Xcalibur
 - Kolona Kinetex Core Shell C18, 150 mm délka, 5,0 µm částice, Phenomenex
 - Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
 - Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
 - Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
 - Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
 - Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW
- Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Detektor FID (Thermo Fischer Scientific, USA) • Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
 - Kolona Zebron ZB-FAME, 30 m × 0,25 mm × 0,20 µm, Phenomenex

4.4 Kultivace kvasinek

Kvasinky byly kultivovány nejprve v mediu Inokulum I. a II. a následně přeočkovány do produkčního média. Produkční medium mělo různý poměr atomu uhlíku k atomu dusíku, a to

v poměrech C/N 13, C/N 25, C/N 50, C/N 100 u mikroorganismů *R. toruloides* a *Y. lipolytica*. U kvasinek rodu *Metchnikowia* byla kultivace v poměrech C/N 97 a C/N 150.



Obrázek č. 11: Kultivace *Rhodosporidium toruloides* C/N 25

4.4.1 Inokulum I. a II.

Začátek pro kultivaci kvasinek představovala příprava kultivačního tekutého média Inokulum I. a II. Inokulum I. zaujímalo objem 40 ml, po jeho sterilaci byly zaočkovány 3 kličky zásobní kultury uchovávané na petriho miskách. Po 24h kultivace v Inokulu I. byly kvasinky zaočkovány do Inokula II. v poměru 1:5, které činilo objem 100 ml. Obě inokula obsahují stejné nutriční hodnoty pro mikroorganismy s rozdílem jejich objemů. Složení Inokula je zapsáno viz (Tabulka č. 3). Pro rod *Metchnikowia* bylo použito Inokulum s jiným složením, viz (Tabulka č. 4), kde objem Inokula I. tvořil 50 ml a II. objem 125 ml.

Tabulka č. 3: Složení tekutého média Inokulum

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
D-glukóza monohydrát	20 g
Bakteriologický pepton	20 g
Kvasničný autolýzát	10 g

Tabulka č. 4: Složení tekutého média Inokulum pro rod *Metchnikowia*

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
D-glukóza monohydrát	20 g
Bakteriální pepton	5 g
Kvasničný autolyzát	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl	0,1 g
MgSO ₄	0,5 g

4.4.2 Produkční médium

Kvasinky byly kultivovány po dobu 48 hodin v mediu Inokulum I a II. a následně zaočkovány do tekutého produkčního média v erlenmeyerových baňkách v poměru 1:5. Kultivace mikroorganismů rodu *R. toruloides* a *Y. lipolytica* probíhala v živném mediu po dobu 96 hodin v různých poměrech C/N. U rodu *Metchnikowia* kultivace trvala 11 dnů, při konstantní teplotě 22 °C v kultivačním boxu. Složení produkčního média v poměru C/N 13 viz (Tabulka č. 5). Obsah živného média pro kvasinky rodu *Metchnikowia*, pro poměr C/N 97, viz (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 5: Složení produkční média C/N 13 pro kmeny *Y. lipolytica* a *R.toruloides*

C/N 13							
	Glu(Gly)/ Kvasničný aut.	Glu(Gly)/ Močovina	Glu(Gly)/ Síran amonný	Glu(Gly)/ Peří	Tuk/ Kvasničný aut.	Tuk/ Močovina	Tuk/ Síran amonný
KH ₂ PO ₄ [g]	4	4	4	4	4	4	4
MgSO ₄ ·7H ₂ O [g]	0,696	0,696	0,696	0,696	0,696	0,696	0,696
Glu(Gly)[g]	33 (30)	33 (30)	33 (30)	33 (30)	-	-	-
Močovina [g]	-	1,8325	-		-	1,8325	-
(NH ₂) ₂ SO ₄ [g]	-	-	4		-	-	4
Kvasničný aut. [g]	7,85	-	-		7,85	-	-
Hydrolyz. tuk [ml]	-	-	-		106,6	106,6	106,6
Peří [ml]	-	-	-	47,5			

Tabulka č. 6: Složení produkční média pro kmen *M. pullcherima* a *M. chrysoperlae* C/N 97

C/N 97				
	Tuk/Kvasničný aut. + pepton	Tuk/ Peří	Glu(Gly)/Peří	Glu(Gly)/Kvasničný aut. + pepton
KH ₂ PO ₄ [g]	7	7	7	7
Na ₂ HPO ₄ [g]	2,5	2,5	2,5	2,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O [g]	1,2	1,2	1,2	1,2
CaCl ₂ ·6H ₂ O [g]	0,15	0,15	0,15	0,15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O [g]	0,02	0,02	0,02	0,02
Glu(Gly) [g]	-	-	246,22 (223,86)	246,22 (223,86)
Kvasničný aut. [g]	1	-	-	1
Pepton [g]	2	-	-	2
Peří [ml]	-	2	2	-
Hydrolyzovaný tuk [ml]	33	33	-	-

4.4.3 Příprava odpadních substrátů

Příprava odpadních substrátů zahrnovala navážení 100 g odpadního tuku, který byl rozpuštěn s 300 ml s přísadkou 10 g hydroxidu sodného. V případě odpadního peří bylo odváženo 81,6 g peří a přidáno 500 ml vody a přidáno rovněž 10 g hydroxidu sodného. Takto připravené substráty byly ponechány 12 hodin na magnetické míchačce s ohřevem při 500 otáčkách za minutu a teplotě 90°C. Vzniklý hydrolyzát byl následně zneutralizován a hodnota pH byla stanovena na přibližně 7,5, pro zajištění optimálních podmínek pro růst mikroorganismů. Byl stanoven obsah dusíku pro odpadní peří, kde v 81,6 g odpovídá 0,06 molu dusíku. V případě odpadního tuku 100 g odpovídá 6,3845 molů uhlíku.

4.4.4 Stanovení nárůstu biomasy a následné zpracování pro analýzy

K nárůstu biomasy, analýze karotenoidů a lipofilních látek byla použita lyofilizovaná forma biomasy kvasinek. Prvním krokem po ukončení kultivace byl odběr 30 ml biomasy do centrifugačních zkumavek a následně její centrifugace při 7000 rpm po dobu 4 minut. Po ukončení procesu byl oddělen supernatant od biomasy, biomasa promyta destilovanou vodou a opět zcentrifugována. V případě médií obsahujících odpadní živočišný tuk, bylo přidáno 5 ml hexanu při promývacím procesu, aby se zamezilo kontaminaci vzorku zbylým tukem. Vzniklá usazená biomasa byla kvantitativně převedena do předem zvážené mikrozkušavky typu Eppendorf. Takto oddělený vzorek byl vložen do chladicího boxu a následně vložen do lyofilizátoru po dobu 24 hodin a poté byly vzorky uchovány v mrazicím boxu. Nárůst biomasy byl následně stanoven gravimetricky v g/l.

4.4.5 Transesterifikace lipidů

První krok představovala příprava transesterifikační směsi složené z 15 % H_2SO_4 v methanolu HPLC kvality s přidavkem inertního standardu kyseliny heptadecanové o koncentraci 0,5 mg/ml. Do krymplovací vialky bylo naváženo přibližně 10 mg zlyofilizované mikrobiální biomasy a přidáno 1,8 ml připravené transesterifikační směsi. Takto připravený vzorek byl uzavřen krymplovacím víčkem a inkubován v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85°C. Po transesterifikaci byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu a poté kvantitativně převeden do vialky o objemu 4 ml, následně bylo přidáno 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a 1 ml hexanu. Vialka se uzavřela a byla vložena na vortex, kde se vzorek třepal po dobu 5 min. Po tomto kroku, se nechal vzorek ustálit, dokud nedošlo k oddělení jednotlivých fází. Horní vrstva vzorku tvořila organickou fázi s methylestery mastných kyselin, ze které bylo odebráno 0,1 ml látky, byla převedena do druhé vialky s přidáním 0,9 ml hexanu. Po uzavření vialky byl vzorek připraven na analýzu pomocí GC.

4.4.6 Izolace karotenoidů a dalších lipidických metabolitů

Zlyofilizovaná biomasa byla navážena do mikrozkušavky v množství zhruba 20-30 mg, byl přidán 1 ml destilované vody a následně byla zkumavka vložena do mrazicího boxu. Tento krok byl učiněn z důvodu lepšího přístupu obsahu metabolitů buňky, kde v boxu dochází ke zmrznutí vody, která následně naruší strukturu buněk. Po zcentrifugování a odstranění vody byl následně přidán aceton v objemu 1 ml a skleněné kuličky. Zkumavka byla poté umístěna do vortexu, kde docházelo k jejímu protřepávání po dobu 25 minut. Po vytřepání byl vzorek kvantitativně převeden do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a byl přidáno 2 ml acetonu. Zkumavka eppendorf byla vypláchnuta 1 ml acetonu a ten byl přidán ke vzorku. Vzorek byl následně odpařen na N_2 odparce a poté rozpuštěn v ethylacetátu HPLC kvality. Na závěr byl vzorek přefiltrován přes filtr, převeden do vialky a uložen do mrazicího boxu.

4.4.7 Analýza lipidů pomocí GC

Plynový chromatograf značky Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph s automatickým dávkováním vzorků a děličem toku byl využit pro vzorky obsahující methylestery mastných kyselin. Pro chromatografickou analýzu byla použita kolona Zebron ZB-FAME. Vyhodnocení PC systémem Chromeleon.

4.4.8 Analýza lipidických látek a karotenoidů pomocí HPLC

Gravimetricky byla odvážena biomasa v rozmezí 20-30 mg do závitových plastových vialek. Následně bylo přidáno 1 ml vody a vzorek vložen do mrazicího boxu, po zmrznutí došlo k porušení struktury mikrobiální biomasy, díky tomu byl získán snadnější přístup k analyzovaným látkám. Po vyjmutí vzorku z mrazicího boxu a jeho rozmrazení byl vložen do centrifugy, která byla nastavena na 1100 ot/min na 2 min. Po odebrání přebytečné vody bylo přidáno 1 ml methanolu, skleněné kuličky a 2 ml chloroformu. Vzorek se nechal třepat na vortexu po dobu 10 min. po uplynutí této doby byl přidán 1 ml vody a vzorek byl na 1 minutu vložen do centrifugy při 2000 ot/min. Po centrifugaci byl vzorek rozdělen na 2 fáze. Spodní fáze byla odebrána a následně odpařena na termobloku pod inertní atmosférou. Následně byl přidán 1 ml chloroformu, vzorek byl protřepán a vložen do skleněné vialky. Vzorek byl tímto připraven pro analýzu. Délka analýzy jednoho vzorku byla 24 minut.

Tabulka č. 7: Složení mobilní fáze A a B

Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
Acetonitril:methanol:trisHCl pufr (pH=8)	Methanol: ethylacetát
80:2:14	60:40

Tabulka č. 8: Gradiendový program pro HPLC analýzu

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	100	0
13	0	
19	0	100
20	100	0
24	100	0

5 Výsledky a diskuze

5.1 Zkoumání vlivu nutričního stresu

V experimentu byly kultivovány rody kvasinek *Rhodosporidium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Metschnikowia chrysoperlae*. Při kultivaci zmíněných mikroorganismů byl měněn poměr uhlíku k dusíku, pro zjištění nejvhodnějšího poměru a zisku největšího množství užitečných látek s přidanou hodnotou. V tabulce č. 5 a 6 zařazené v podkapitole 3.4.2., jsou zapsána jednotlivá produkční média, na kterých byly kvasinky kultivovány. Jako zdroj uhlíku byl využit odpadní tuk a pro srovnání využitelnosti glukóza a glycerol. Dále jako odpadní zdroj dusíku bylo využito peří, které se srovnávalo se zdroji dusíku jako je močovina, síran amonný, pepton, kvasničný autolyzát a odpadní peří. Pro všechny experimenty byl sledován nárůst biomasy v g/l, koncentrace vybraných lipidických metabolitů $\mu\text{g/g}$ biomasy, akumulace lipidů a procentuální zastoupení mastných kyselin.

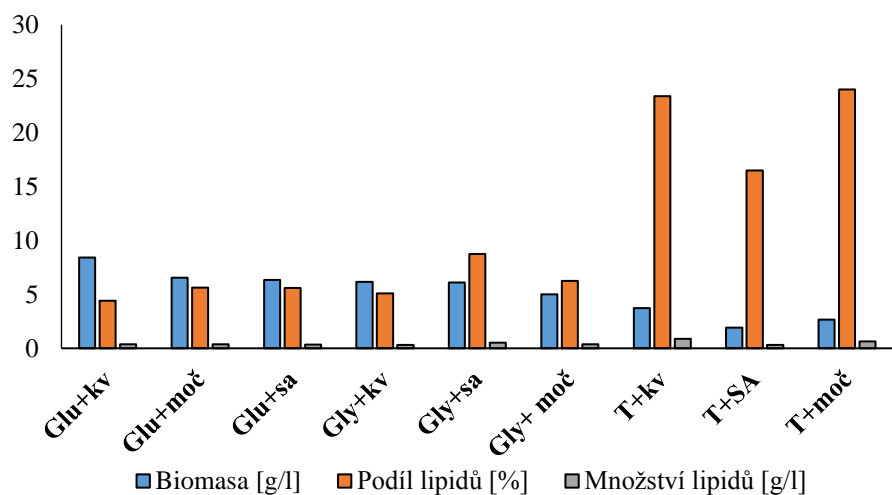
5.2 Kultivace kmene *Rhodosporidium toruloides*

Kultivace kvasinky kmene *Rhodosporidium toruloides* v živném mediu byla provedena při poměrech C/N 13, C/N 25, C/N 50 a C/N 100.

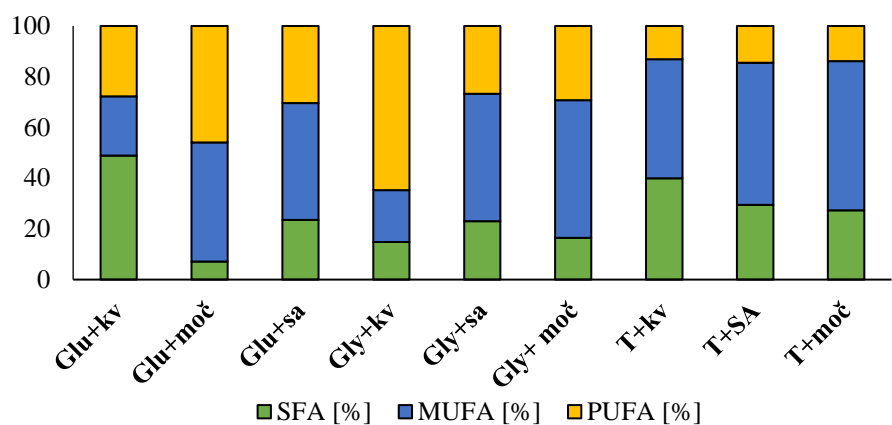
5.2.1 Kultivace při poměru C/N 13

Při kultivaci kvasinky kmene *R. toruloides* v mediu o poměru C/N 13 byly naměřeny následující hodnoty. Procentuální podíl lipidů a celkový nárůst biomasy je zaznamenán v grafu (Obrázek č. 12) z něhož lze vyčíst, že největší zastoupení lipidů připadá na kultivaci v mediu složeného z hydrolyzovaného tuku jako zdroje uhlíku. Je patrné, že při použití média s odpadním tukem je podíl MK srovnatelný. Nejvyšší produkce polynenasycených mastných kyselin bylo dosaženo při využití média glukóza a kvasničného autolyzáta. Naopak nejnižší produkce PUFA byla zaznamenána u média se složením odpadního tuku a kvasničného autolyzáta.

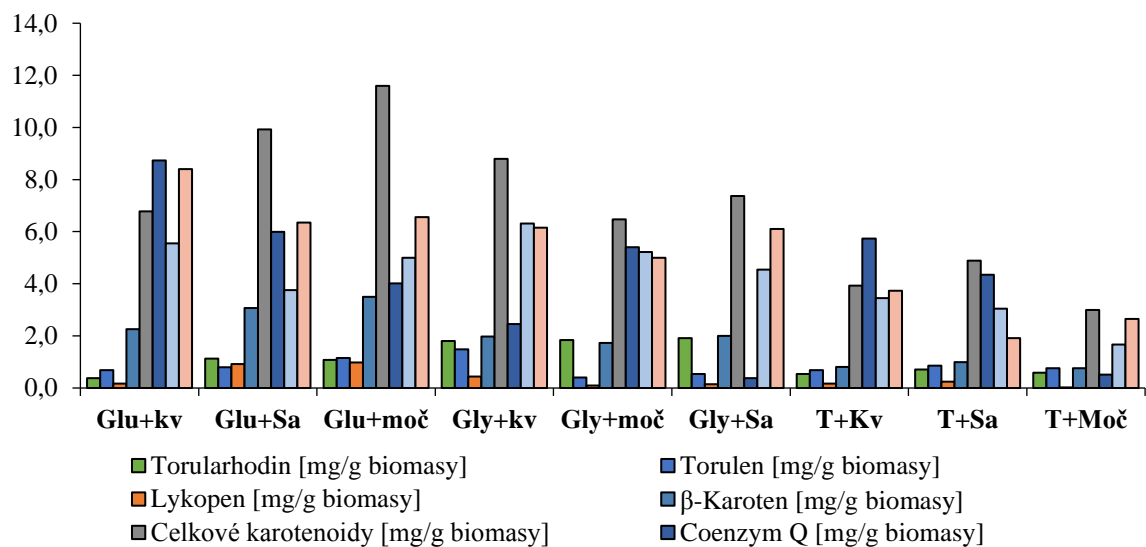
Nárůst biomasy při poměru C/N 13 u kvasinky *Rhodosporidium Toruloides* je nejvyšší při použití glukózy, která je zdrojem uhlíku a kvasničného autolyzáta jako zdroje dusíku. Toto médium mělo také největší zastoupení SFA v biomase. Akumulace lipidů v biomase je uvedena na druhém grafu (Obrázek č. 13), kde největší podíl lipidů byl obsažen v mediu, jako zdroj uhlíku byl využit odpadní tuk a jako zdroj dusíku močovina. Zároveň při kultivaci v tomto mediu bylo dosaženo největší produkce koenzymu Q, viz (Obrázek č. 14). Ovšem v tomto případě bylo vyprodukováno nejméně karotenoidů.



Obrázek č. 12: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 13



Obrázek č. 13: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 13

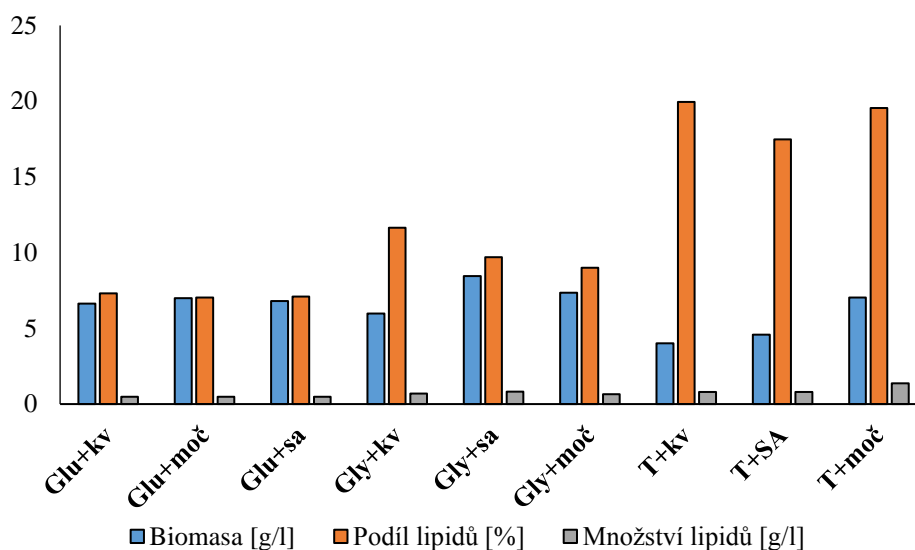


Obrázek č. 14: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N13

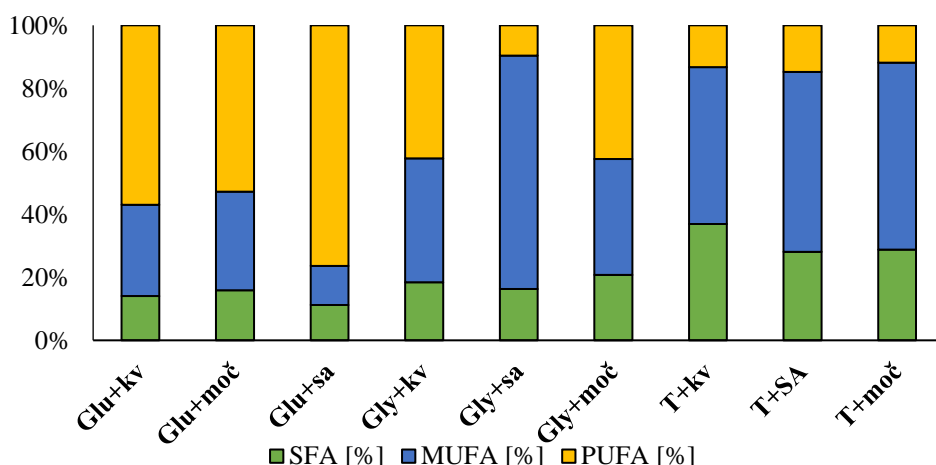
5.2.2 Kultivace při poměru C/N 25

Celkový podíl lipidů a biomasy zachycuje (Obrázek č. 15), kdy proběhla kultivace v poměru C/N 25. Největší procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo naměřeno u kultivace v živném médiu obsahující hydrolyzovaný tuk. Největší nárůst biomasy při tomto poměru byl naměřen při kultivaci v mediu sestaveného z glycerolu a síranu amonného. Celkový poměr MK u daných médií je znázorněn v grafu (Obrázek č. 16). V případě kultivace kvasinek v živném mediu s využitím hydrolyzovaného tuku jako zdroje uhlíku lze pozorovat přibližně stejné zastoupení SFA, MUFA a PUFA. Nejvyšší hodnota PUFA byla zaznamenána u kultivace v živném mediu složeného z glukózy a síranu amonného. V případě média tvořeného z glycerolu a síranu amonného byla naměřena nejvyšší hodnota MUFA. Poměr zastoupení SFA u média, kde jako zdroj uhlíku byl využit glycerol a glukóza, je přibližně totožný.

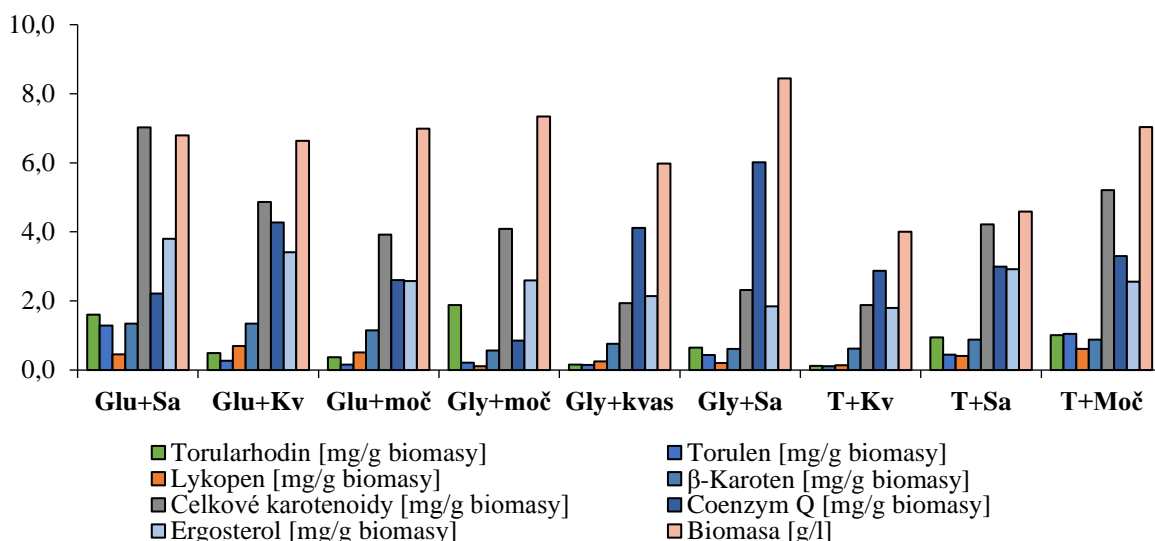
Naměřený nárůst biomasy a jednotlivých metabolitů je zaznamenán na grafickém znázornění viz (Obrázek č. 17). V případě produkčního média obsahujícího glycerol a síran amonný můžeme vidět největší podíl koenzymu Q. Lze tedy usoudit, že produkce lipidů v živném mediu je vysoká na úkor tvorby celkových karotenoidních barviv. Z výsledků je patrné, že využití hydrolyzovaného tuku má příznivý vliv na tvorbu vysokého obsahu lipidů v biomase.



Obrázek č. 15: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 25



Obrázek č. 16: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 25

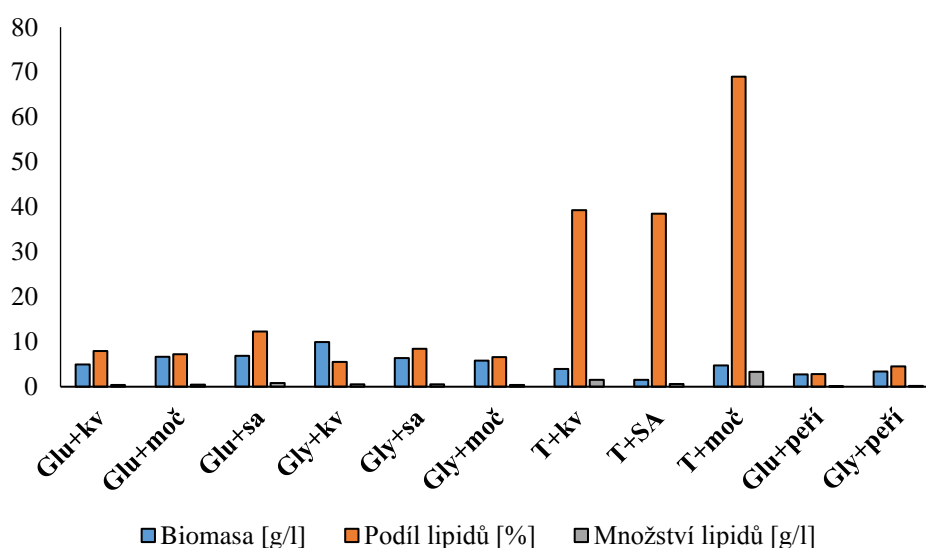


Obrázek č. 17: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 25

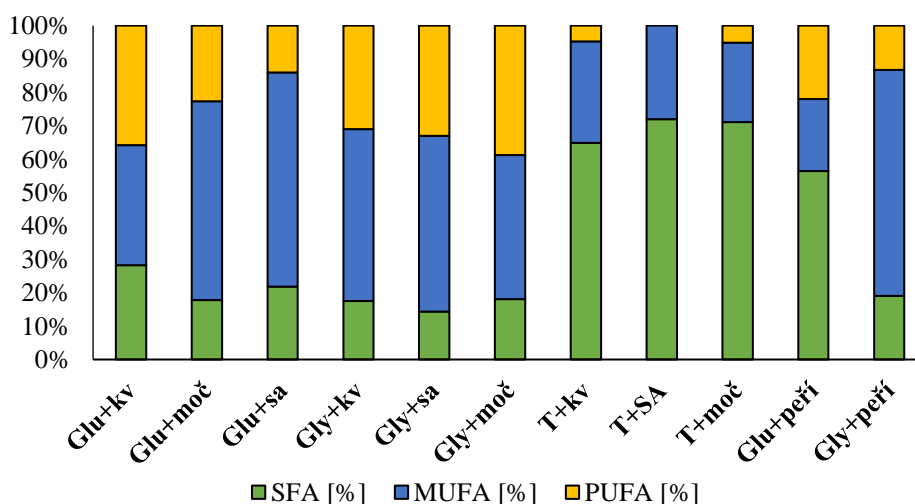
5.2.3 Kultivace při poměru C/N 50

Na obrázcích č. 18, 19 a 20 jsou zaznamenány hodnoty vzniklé kultivací kvasinky kmene *R. toruloides* při poměru C/N 50. Největší procentuální podíl lipidů v biomase byl opět vytvořen při kultivaci v médiu, kde jako zdroj uhlíku působil hydrolyzovaný tuk, viz (Obrázek č. 18). V případě využití odpadního peří jako zdroje dusíku ve spojení glukózy či glycerolem byl podíl naměřených lipidů nejmenší. Při porovnání vytvořených mastných kyselin byl největší podíl SFA naměřen u kultivace v mediu složeného z hydrolyzovaného tuku, kde se jejich hodnota blížila $\frac{3}{4}$ z celkového poměru MK. V případě kultivace v médiu složeného z hydrolyzovaného tuku a síranu amonného, bylo procentuální zastoupení PUFA nulové. U kultivace kvasinky pomocí média složeného z glukózy a glycerolu spojeného se síranem amonným, močovinou a kvasničním autolýzátem bylo zastoupení SFA, MUFA a PUFA přibližně stejné, největší procentuální zastoupení tvořily MUFA, viz (Obrázek č. 19). Při využití odpadního peří ve spojení s glukózou a glycerolem byly hodnoty zcela opačné. Z grafického znázornění viz

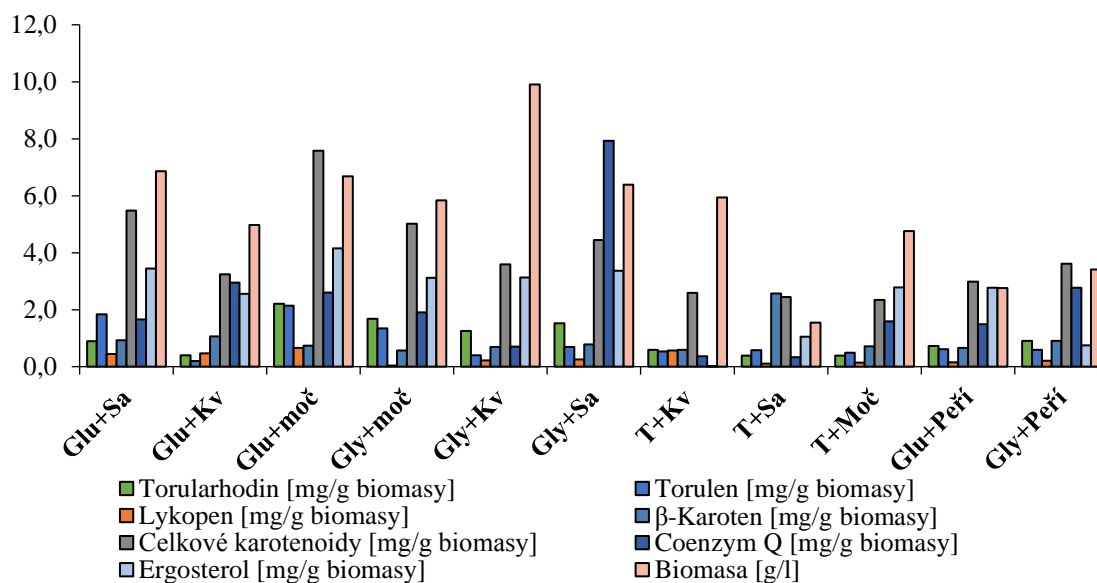
(Obrázek č. 20), lze vypořádat nárůst biomasy a jednotlivých sledovaných metabolitů. Při daném poměru C/N 50 lze vysledovat, že zastoupení celkových karotenoidů bylo největší u kultivace v médiu složeném z glukózy a glycerolu ve spojení se síranem amonným, močovinou a kvasničným autolyzátem. V případě média složeného z odpadního tuku vidíme, že obsah karotenoidů je nejmenší, ovšem na rozdíl od ostatních je podíl lipidů v biomase nejvyšší. Lze tedy vyvodit, že tvorba vyššího procentuálního zastoupení lipidů, je na úkor tvorby karotenoidních barviv. V případě tukových médiích mohou být vysoké hodnoty zkreslené zbytkovým tukem kontaminujícím biomasu. Tento efekt však bude minimální, protože vzorky s tukovými médii byly při stáčení a promývání, promyty i malým množstvím hexanu, aby se tento negativní efekt eliminoval.



Obrázek č. 18: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 50



Obrázek č. 19: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 50

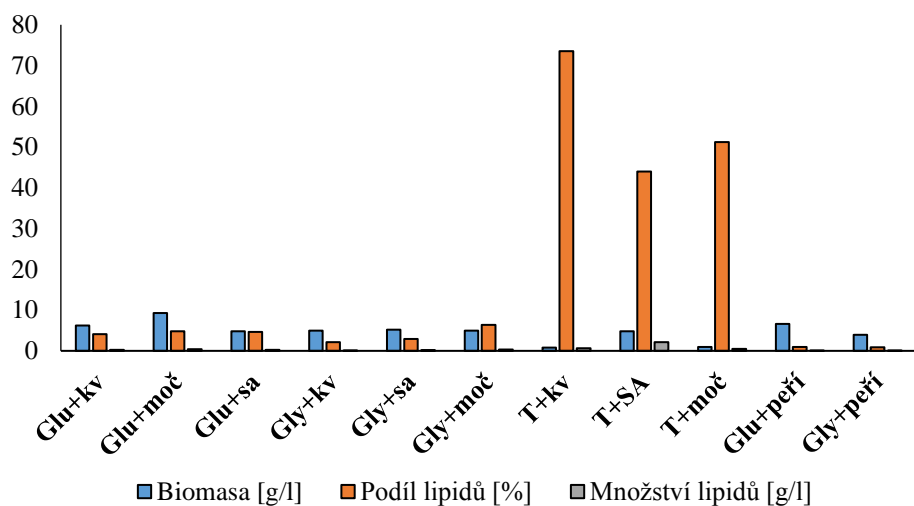


Obrázek č. 20: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 50

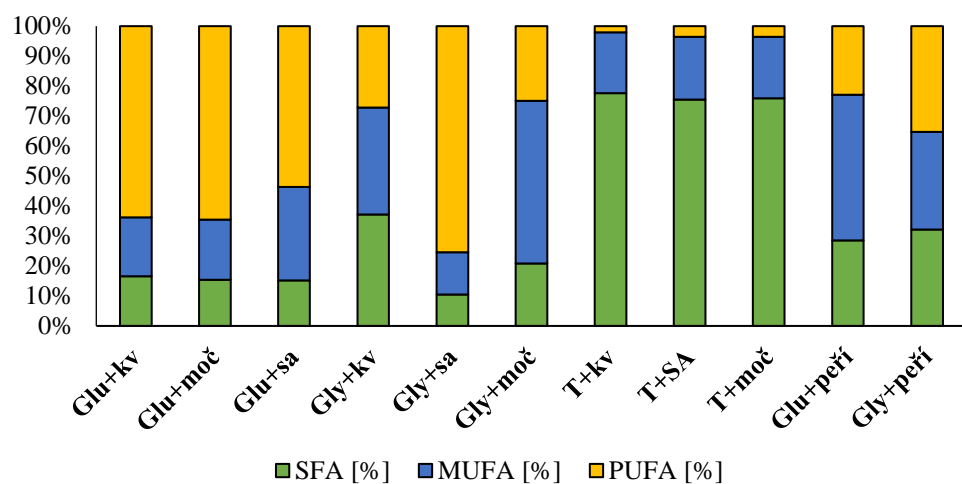
5.2.4 Kultivace při poměru C/N 100

V případě kultivace kvasinky kmene *R. toruloides* při poměru C/N 100 lze z grafického znázornění (Obrázek č. 21) je patrné, že největší procentuální podíl lipidů v biomase je za využití média obsahujícího hydrolyzovaný tuk. Naopak nejmenší zastoupení lipidické složky v biomase je zaznamenáno při využití média složeného z glukózy a glycerolu společně s odpadním peří, jako zdroje dusíku. Procentuální zastoupení MK je znázorněn v grafu (Obrázek č. 22) a vyplývá z toho, že u kultivace na médiu složeného z odpadního tuku je nejvyšší podíl SFA a zároveň tvoří přes $\frac{3}{4}$ podílu celkových MK. V případě kultivace v médiu složeného z glycerolu a síranu amonného lze vidět opačný trend. Zastoupení SFA je v nejnižším poměru ze všech naměřených hodnot při poměru C/N 100, ovšem zastoupení PUFA je naopak největší. U média s využitím odpadního peří spolu s glukózou a glycerolem je zastoupení MK téměř rovnoměrné a největší podíl tvoří MUFA.

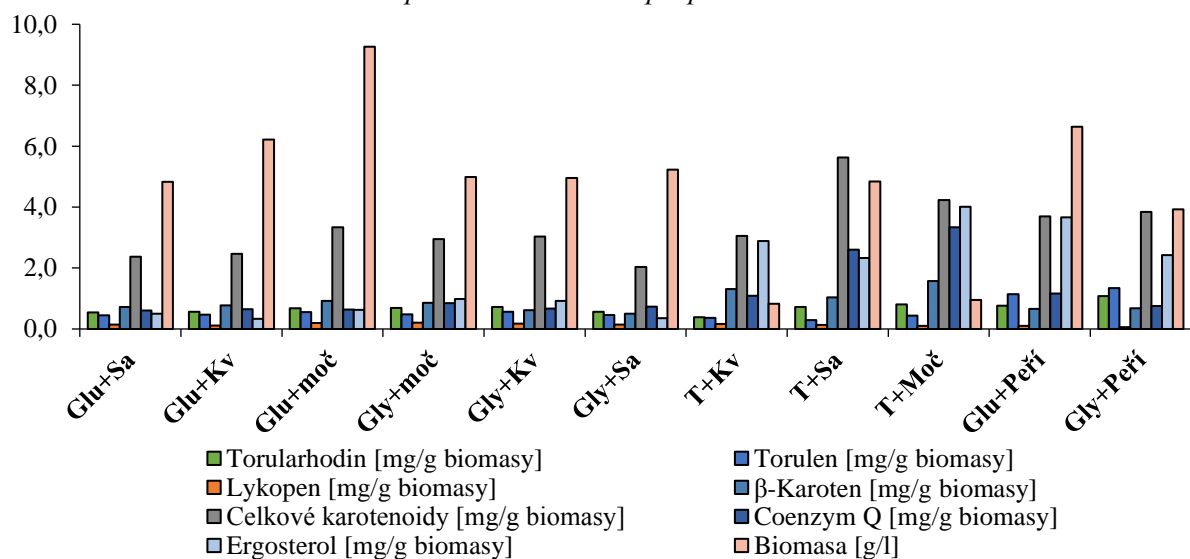
Největší podíl torularhodinu byl naměřen u kultivace kvasinky v médiu složeném z glycerolu, jako zdroje uhlíku a odpadního peří, jako zdroje dusíku, viz (Obrázek č. 23). Rovněž podíl celkových karotenoidů patří k nejvyšším oproti ostatním vzorkům. V porovnání s předešlou kultivací v poměru C/N 50 je viditelné, že nejvyšší podíl celkových karotenoidů a obsah lipidů v biomase je právě na médiu složeném z hydrolyzovaného tuku. Jednotlivé zastoupení celkových karotenoidů tedy s vyšším poměrem C/N klesá.



Obrázek č. 21: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 100



Obrázek č. 22: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 100



Obrázek č. 23: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Rhodosporidium toruloides* při poměru C/N 100

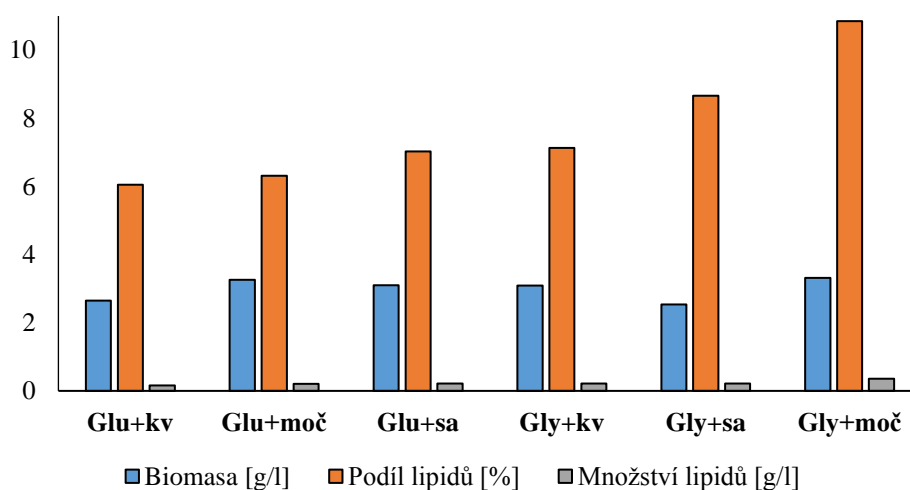
5.3 Kultivace kmene *Yarrowia lipolytica*

Kultivace kvasinky kmene *Yarrowia lipolytica* v produkčním mediu byla provedena při poměrech C/N 13, C/N 25, C/N 50 a C/N 100.

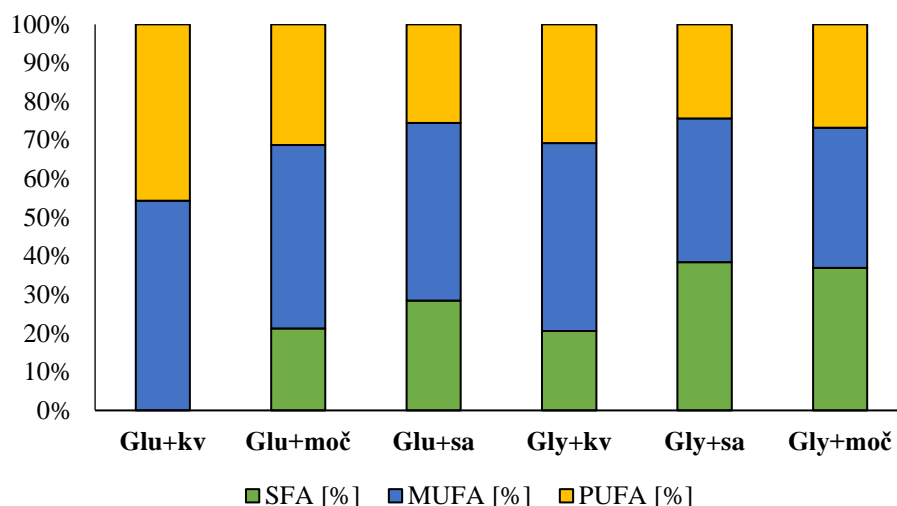
5.3.1 Kultivace při poměru C/N 13

V případě využití poměru C/N 13 je celkové procentuální zastoupení lipidů a množství biomasy je graficky znázorněno viz (Obrázek č. 24). Nejvyšší podíl lipidů a biomasy byl naměřen u kultivace v živném mediu složeném z glycerolu a močoviny. (Obrázek č. 25) znázorňuje procentuální zastoupení jednotlivých druhů MK. Naměřené hodnoty vzniklé při kultivaci kvasinky kmene *Y. lipolytica*, v mediu složeném z glukózy a kvasničného autolýzátu, vypovídají o nulovém zastoupení SFA. Při využití daného média je podíl MUFA a PUFA téměř totožný.

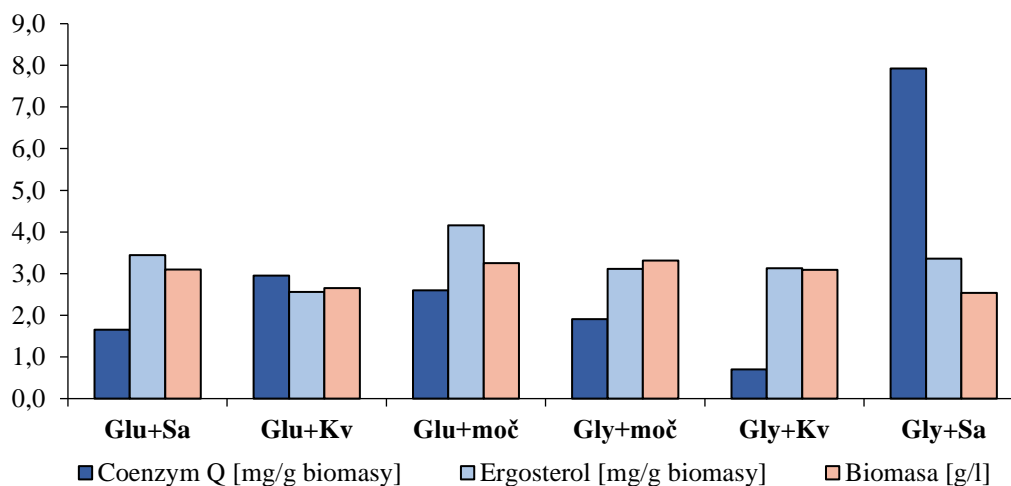
Jednotlivé metabolity a nárůst biomasy sledované při procesu kultivace jsou znázorněny v grafu (Obrázek č. 26). Při využití média tvořeného z glycerolu a síranu amonného byl viditelně vyšší podíl koenzymu Q v porovnání s ostatními. Nárůst biomasy u všech sledovaných kultivací při poměru C/N 13 je přibližně stejný. Nejnižší zastoupení koenzymu Q bylo zaznamenáno při kultivaci médiem složeným z glycerolu a kvasničného autolýzátu. Podíl naměřeného ergosterolu byl u všech vzorků téměř totožný, nejvyšší podíl byl zaznamenán při kultivaci v mediu glukózy a močoviny.



Obrázek č. 24: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 13



Obrázek č. 25: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 13

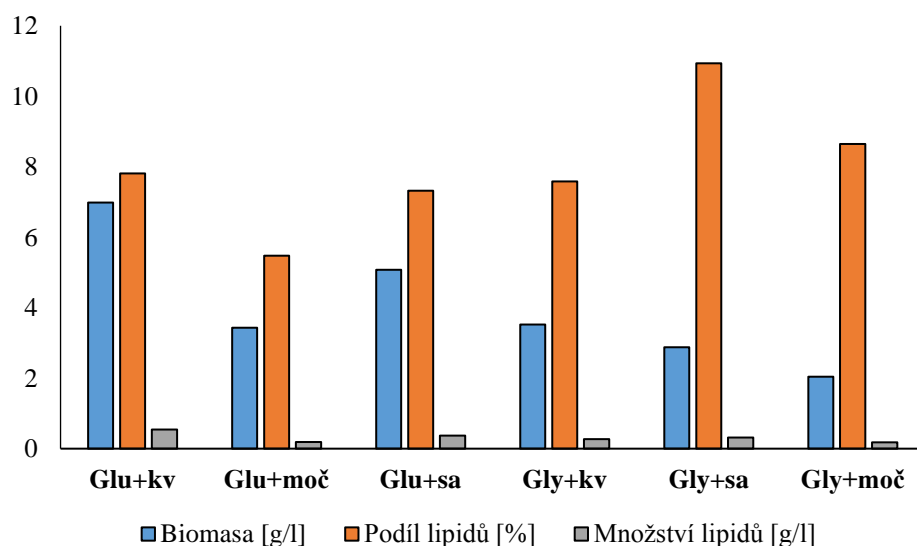


Obrázek č. 26: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N13

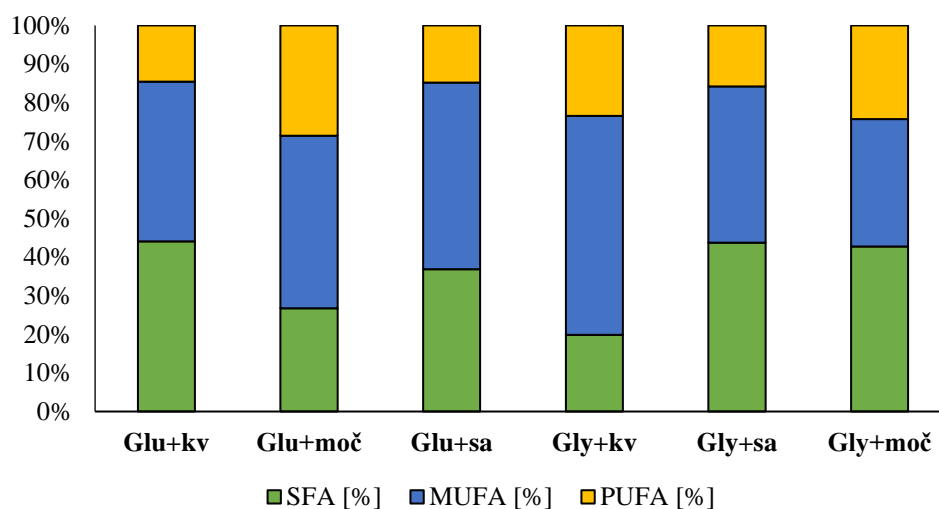
5.3.2 Kultivace při poměru C/N 25

Z grafu (Obrázek č. 27) vyplívá vyjádření procentuálního podílu lipidů v biomase a nárůst celkové biomasy při kultivaci kmene *Y. lipolytica* s využitím poměru C/N 25. Lze zde vyčíst, že největší procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo naměřeno při kultivaci v médiu složeného z glycerolu jako zdroje uhlíku a síranu amonného jako zdroje dusíku. Ovšem celkový nárůst biomasy je v případě tohoto vzorku výrazně nízký. Největší nárůst kvasinkové biomasy byl naměřen při kultivaci v médiu obsahujícím glukózu a kvasničný autolyzát. Podíl MK je znázorněn na vyobrazen viz (Obrázek č. 28), zde si lze povšimnout nejvyššího podílu SFA zaznamenaného při kultivaci v médiu složeném z glukózy a kvasničného autolyzátu, kde byl rovněž naměřen nejnižší podíl PUFA. Kultivace vzorku v médiu tvořícím glycerol a kvasničný autolyzát vykazovala nejvyšší zastoupení MUFA.

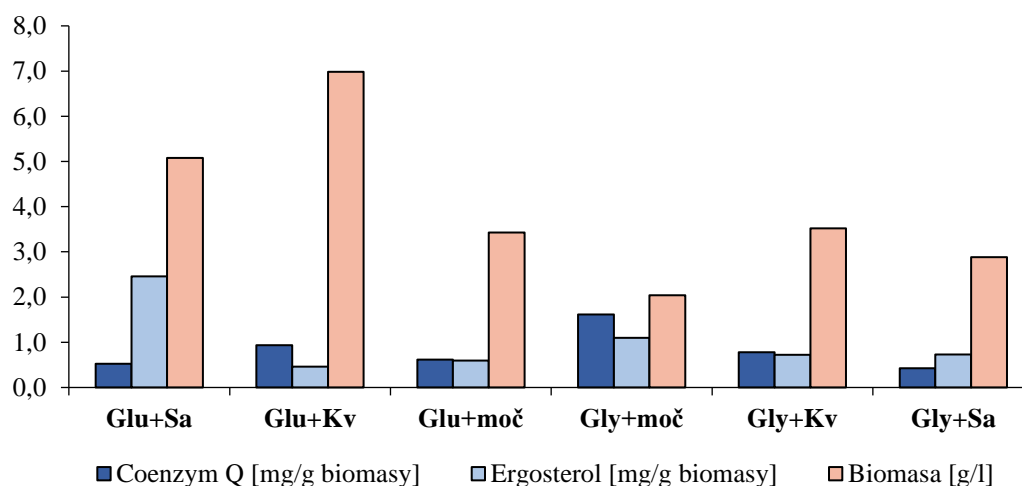
Jednotlivé sledované metabolity jako je ergosterol, koenzym Q a nárůst biomasy jsou znázorněny na grafu (Obrázek č. 29). Poměr uvedených metabolitů ve všech vzorcích se téměř shoduje, výjimku tvoří kultivace v mediu, které obsahovalo glycerol a močovinu, zastoupení koenzymu Q je zde nejvyšší a hodnota ergosterolu je nejvyšší při využití média složeného z glukózy a síranu amonného v daném poměru C/N 25.



Obrázek č. 27: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 25



Obrázek č. 28: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 25

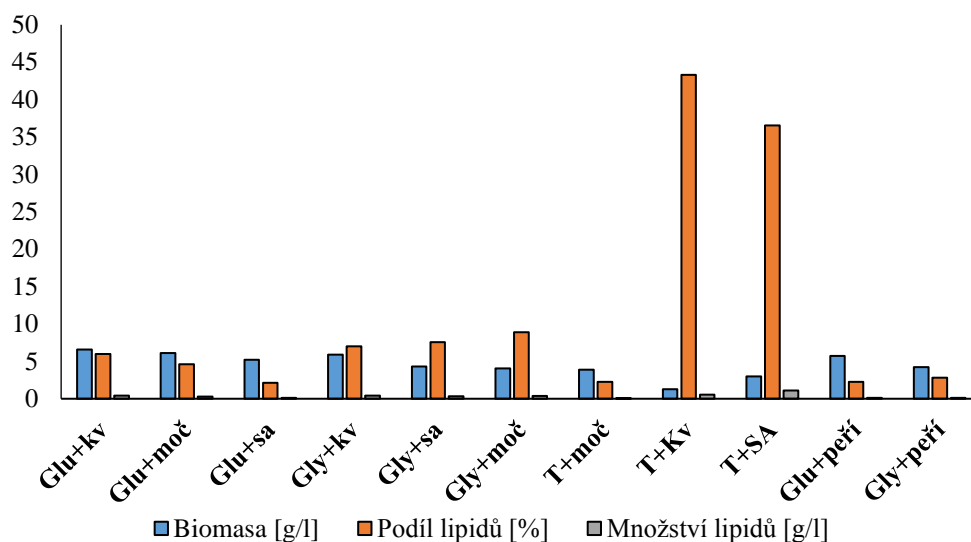


Obrázek č. 29: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 25

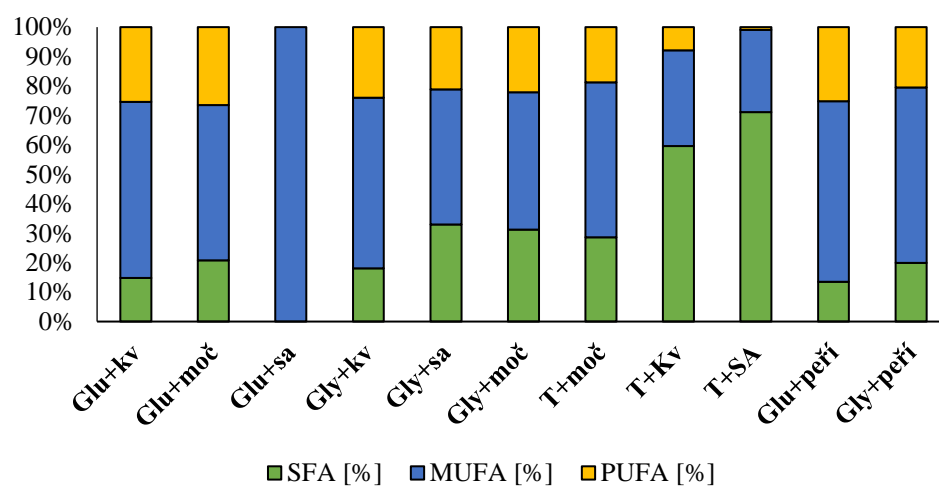
5.3.3 Kultivace při poměru C/N 50

Výsledek kultivace s využitím poměru C/N 50 je zaznamenán na grafickém zobrazení (Obrázek č. 30), který popisuje procentuální podíl lipidů v biomase a celkový nárůst biomasy. Z tohoto grafu je patrné, že největší zastoupení lipidů je naměřeno u kultivace v produkčním mediu složeném z hydrolyzovaného tuku a kvasničného autolyzátu, i v živném mediu obsahujícím hydrolyzovaný tuk a síran amonný. Oproti tomu nejmenší zastoupení lipidů je patrné při kultivaci s médiem, které bylo opět tvořeno hydrolyzovaným tukem, v tomto případě byla jako zdroj dusíku použita močovina. Celkové zastoupení MK, jejichž hodnoty byly naměřeny při využití poměru C/N 50 u kmene *Y. lipolytica* je zobrazeno v grafu (Obrázek č. 31). Zde si lze povšimnout, že u kultivace v mediu tvořeném glukózou a síranem amonným je 100% obsah MUFA. Tento extrémní výsledek může být zapříčiněn působením několika faktorů. S největší pravděpodobností došlo k neúplné transesterifikaci vzorku, a tudíž tato hodnota musí být brána s rezervou. Dalším extrémem je výsledek kultivace při použití média složeného z hydrolyzovaného tuku a síranu amonného, kde byl naměřen největší podíl SFA a téměř nulový podíl PUFA.

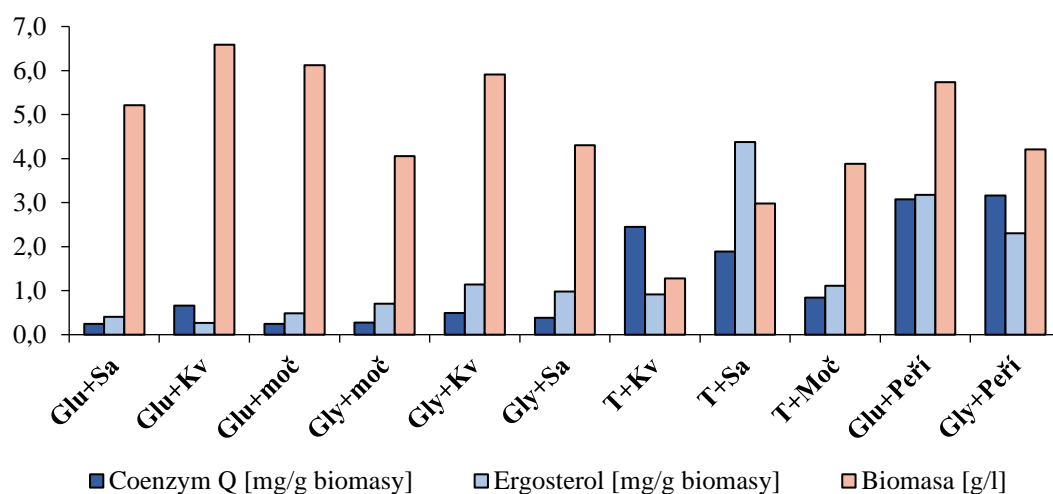
Jednotlivé metabolity včetně biomasy při využití C/N 50 jsou znázorněny na (Obrázek č. 32). V případě kultivace kvasinky v mediu složeném z hydrolyzovaného tuku a síranu amonného byla naměřena nejvyšší hodnota ergosterolu. Oproti tomu nejvyšší hodnota koenzymu Q byla zaznamenána při kultivaci v mediu tvořeném glycerolem a odpadním peřím, jako zdrojem dusíku.



Obrázek č. 30: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 50



Obrázek č. 31: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 50

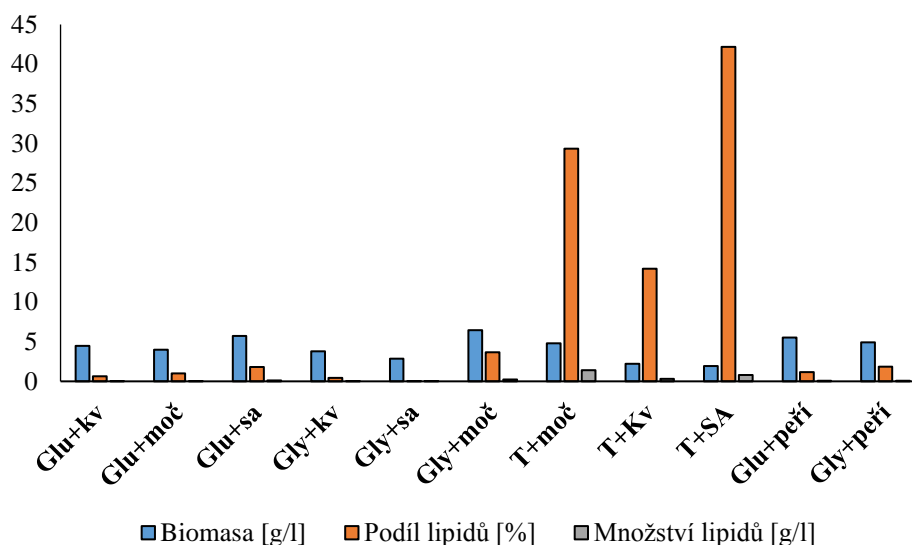


Obrázek č. 32: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 50

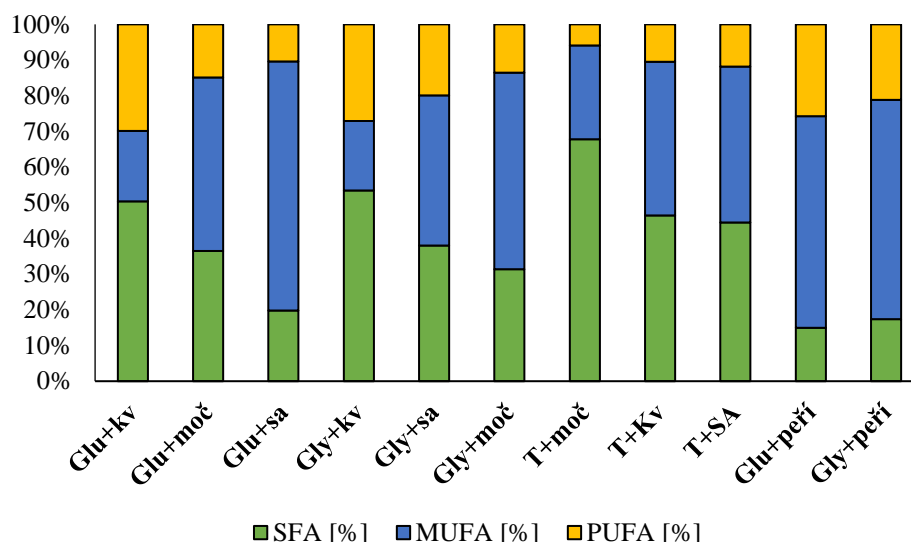
5.3.4 Kultivace při poměru C/N 100

Nárůst celkové biomasy a podílu lipidů při poměru C/N 100 je znázorněn na (Obrázek č. 33). Nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase bylo zaznamenáno při kultivaci v médiu obsahujícím jako zdroj uhlíku hydrolyzovaný tuk. V tomto případě byl ovšem celkový nárůst biomasy velmi nízký. Oproti tomu nejnižší naměřený poměr lipidů v biomase byl naměřen v případě kultivace v médiu s glukózou a glycerolem jako zdroje uhlíku, a síranu amonného, močoviny a kvasničného autolýzátu jako zdroje dusíku. Kultivace v médiu obsahujícím glycerol a močovinu je podíl lipidů poměrně vyšší. (Obrázek č. 34) vyobrazuje procentuální zastoupení naměřených MK. Nejvyšší hodnota SFA byla naměřena v případě kultivace kvasinky na produkčním médiu složeném z hydrolyzovaného tuku a močoviny. Ovšem hodnota PUFA je zde znatelně nižší než u ostatních vzorků. Nejvyšší podíl MUFA byl naměřen při kultivaci v médiu složeném z glukózy a síranu amonného, dále pak glukózy a glycerolu ve spojení s odpadním peřím.

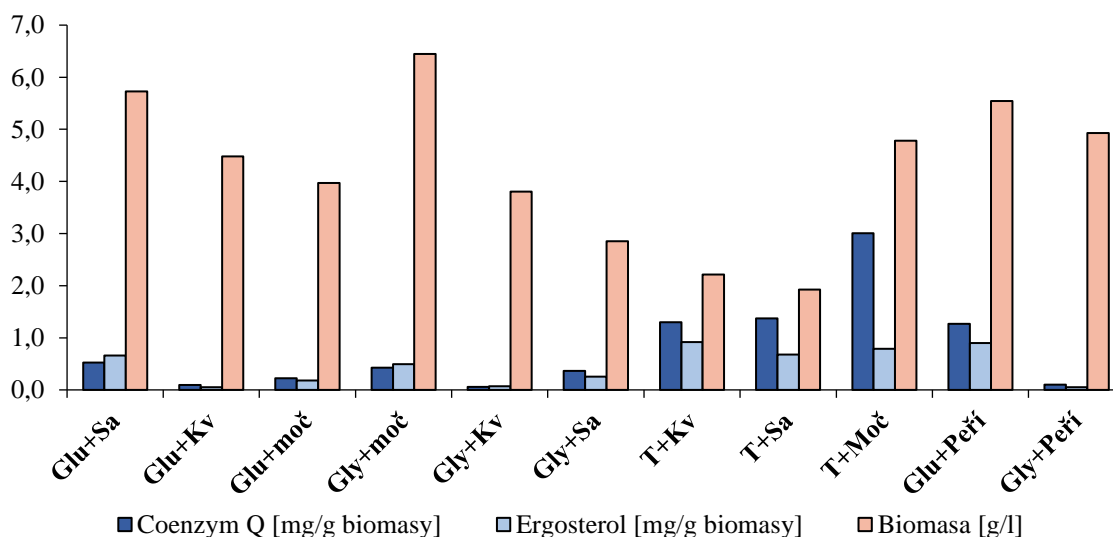
Naměřené hodnoty jednotlivých metabolitů a nárůst biomasy je vyobrazen na (Obrázek č. 35). Největší zastoupení koenzymu Q je ve vzorcích kultivovaných s mediích s obsahem hydrolyzovaného tuku jako zdroje uhlíku. Téměř nulová hodnota ergosterolu je zaznamenána v případě kultivace pomocí média s obsahem glycerolu a peří, glukózy a glycerolu s kvasničným autolýzátem.



Obrázek č. 33: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 100



Obrázek č. 34: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 100



Obrázek č. 35: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Yarrowia lipolytica* při poměru C/N 100

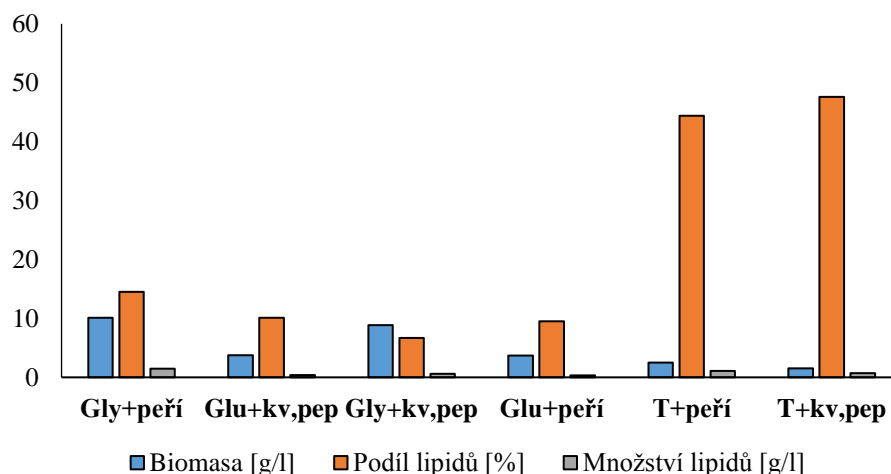
5.4 Kultivace kmene *Metschnikowia pulcherrima*

Kultivace kmene *Metschnikowia pulcherrima* byl kultivována v produkčních médiích v poměrech C/N 97 a C/N 150.

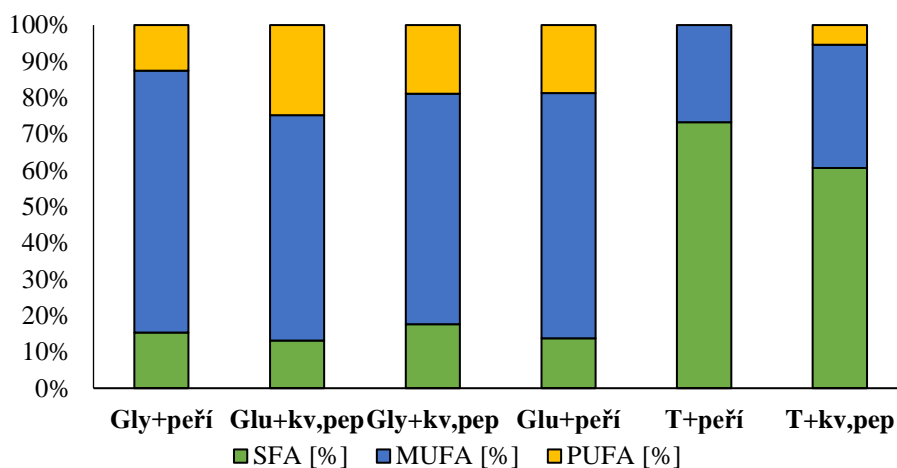
5.4.1 Kultivace při poměru C/N 97

Kultivace kvasinky kmene *M. pulcherrima* při poměru C/N 97 s procentuálním podílem lipidů v biomase a celkovým nárůstem biomasy je vyobrazen na (Obrázek č. 36). Nejvyšší hodnota lipidů v biomase je tvořena při kultivaci v mediu složeném z hydrolyzovaného tuku ve spojení s odpadním peřím a kvasničním autolýzátem spolu s peptonem. V případě uvedeného média složeného z hydrolyzovaného tuku a peří, lze vypočítat nulový podíl PUFA viz

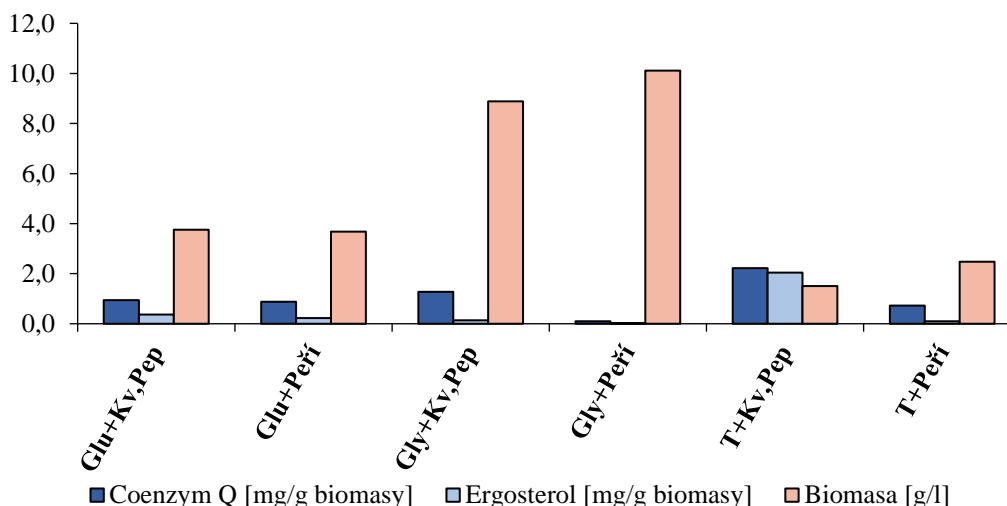
(Obrázek č. 37) a zároveň nejvyšší podíl SFA ze sledovaných vzorků. Kultivace v médiu složeném z glycerolu a peří se vyznačuje nejvyšším podílem MUFA. Nejvyšší hodnotu PUFA vykazuje vzorek kultivovaný v médiu složeném z glukózy jako zdroje uhlíku a kvasničného autolyzátu spolu s peptonem jako zdroje dusíku. Při poměru média C/N 97, kultivované kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*, tvořícího glycerol a peří je naměřeno takřka nulové hodnoty ergosterolu a koenzymu Q viz (Obrázek č. 38). Na rozdíl od nejvyšších hodnot uvedených metabolitů naměřených při kultivaci v mediu složeného z hydrolyzovaného tuku a kvasničného autolyzátu a peptonu.



Obrázek č. 36: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Metschnikowia pulcherrima* při poměru C/N 97



Obrázek č. 37: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Metschnikowia pulcherrima* při poměru C/N 97

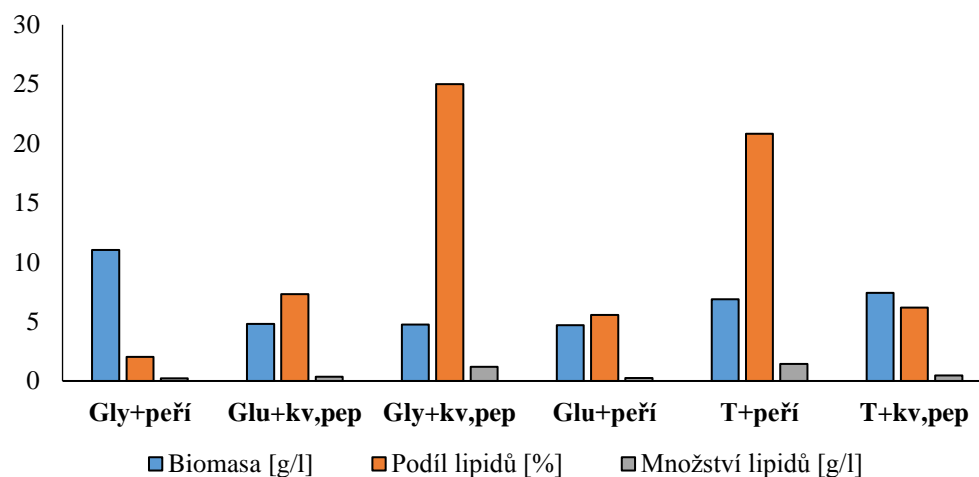


Obrázek č. 38: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Metschnikowia pullcherima* při poměru C/N 97

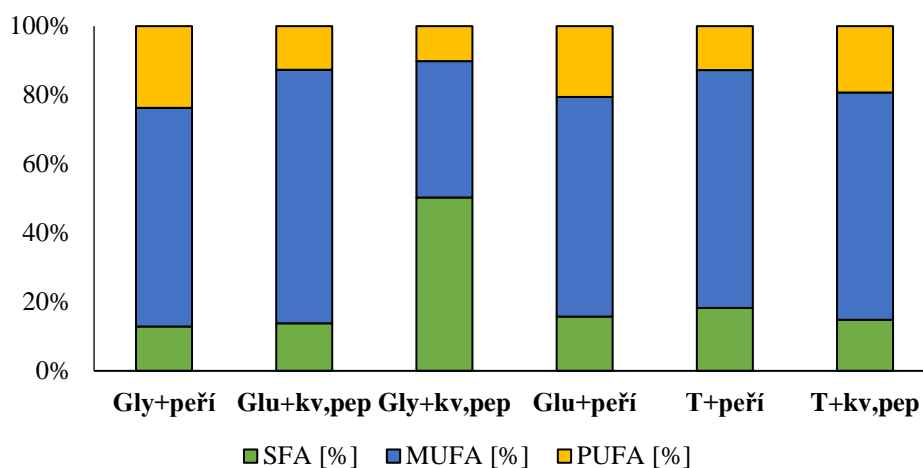
5.4.2 Kultivace při poměru C/N 150

Při kultivaci kvasinky v médiu při poměru C/N 150 vykazuje nejvyšší procentuální podíl lipidů v biomase vzorek obsahující glycerol, kvasničný autolyzát společně s peptonem, viz (Obrázek č. 39). O něco nižší hodnotu vykazuje vzorek kultivovaný v médiu tvořící hydrolyzovaný tuk a peří. Nejvyšší zaznamenanou hodnotu nárůstu biomasy byla naměřena v případě kultivace média složeného glycerolem a odpadního peří. Poměr zastoupených MK je vyobrazen na (Obrázek č. 40). Ve všech naměřených vzorcích více než polovinu MK tvoří MUFA. Nejnižší zaznamenaná hodnota SFA byla naměřena u vzorku s kultivací v médiu obsahujícím glycerol a peří, kde rovněž můžeme pozorovat i nejvyšší hodnotu PUFA. V případě MUFA je nejvyšší hodnota zaznamenaná u vzorku kultivovaném v médiu z glukózy a kvasničného autolyzátu společně s peptonem.

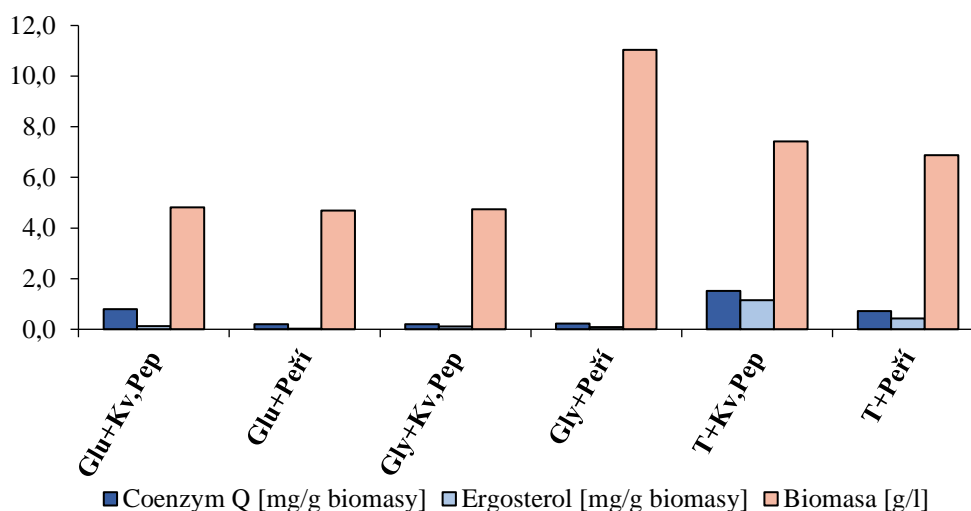
Nejvyšší hodnota koenzymu Q a ergosterolu naměřena při kultivaci v médiu složeném z hydrolyzovaného tuku a kvasničného autolyzátu společně s peptonem viz (Obrázek č. 41). Celkově lze konstatovat, že při zvyšujícím se poměru C/N u kvasinky kmene *M. pulcherrima* dochází ke snížení obsahu koenzymu Q a ergosterolu.



Obrázek č. 39: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Metschnikowia pulcherrima* při poměru C/N 150



Obrázek č. 40: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Metschnikowia pulcherrima* při poměru C/N 150



Obrázek č. 41: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Metschnikowia pulcherrima* při poměru C/N 150

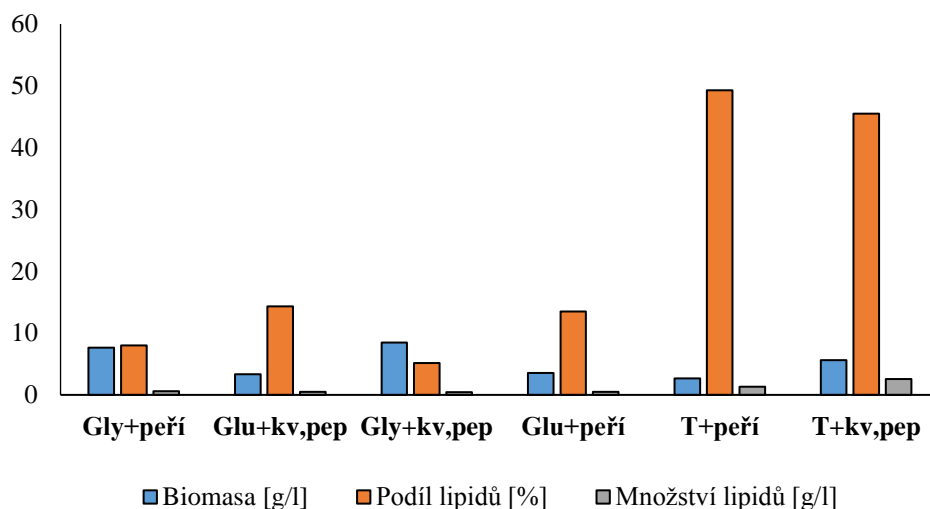
5.5 Kultivace kmene *Metschnikowia chrisoperlae*

Kvasinka kmene *Metschnikowia chrisoperlae* byla kultivována v živném médiu při poměrech C/N 97 a C/N 150.

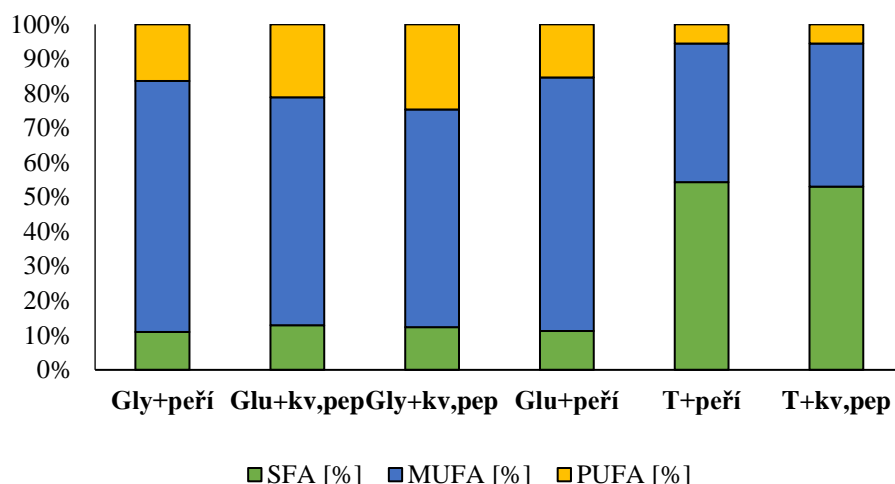
5.5.1 Kultivace při poměru C/N 97

V případě kultivace kvasinky kmene *M. chrisoperlae* při poměru C/N 97 je nejvyšší procentuální zastoupení lipidů v biomase při využití média složeného z hydrolyzovaného tuku a peří, rovněž také s totožným zdrojem uhlíku a kvasničným autolyzátem společně s peptonem, viz (Obrázek č. 42). Nejvyšší nárůst biomasy byl naměřen v případě kultivace v médiu tvořeném glycerolem a kvasničným autolyzátem spolu s peptonem. Poměrně shodné hodnoty SFA, MUFA a PUFA lze vypočítat při využití médií složených z glycerolu a glukózy jako zdroje uhlíku ve spojení s odpadním peřím, kvasničným autolyzátem spolu s peptonem, viz (Obrázek č. 43). Podobné hodnoty jsou naměřeny při využití média tvořeného hydrolyzovaným tukem s odpadním peřím a kvasničným autolyzátem spolu s peptonem, kde největší zastoupení v případě obou médií měly SFA a nejnižší hodnoty představovaly PUFA. Nejvyšší hodnotu MUFA vykazoval vzorek v případě využití média složeného z glycerolu a odpadního peří.

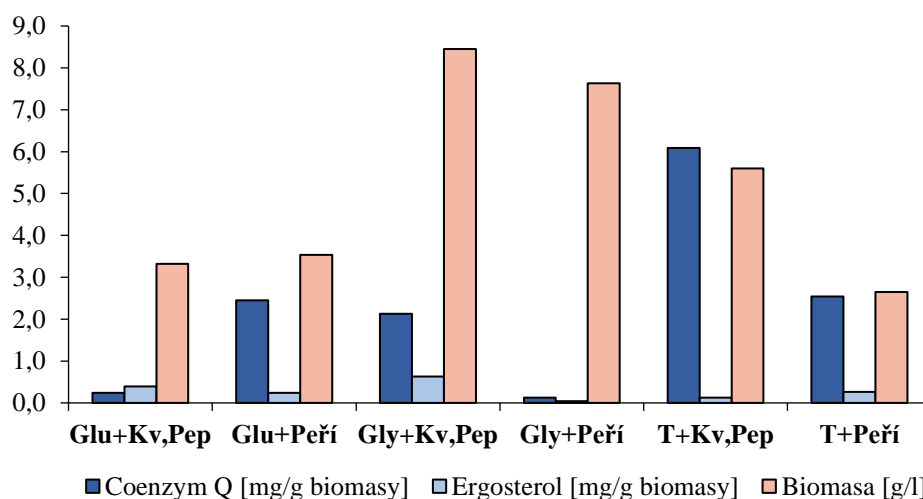
Podíl koenzymu Q, ergosterolu a biomasy je zaznamenán na (Obrázek č. 44), ze kterého je patrné, že nejvyšší hodnota koenzymu Q se vyskytuje v případě kultivace médiem složeným z hydrolyzovaného tuku a kvasničného autolyzátu spolu s peptonem.



Obrázek č. 42: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Metschnikowia chrisoperlae* při poměru C/N 97



Obrázek č. 43: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Metschnikowia chrysoperlae* při poměru C/N 97



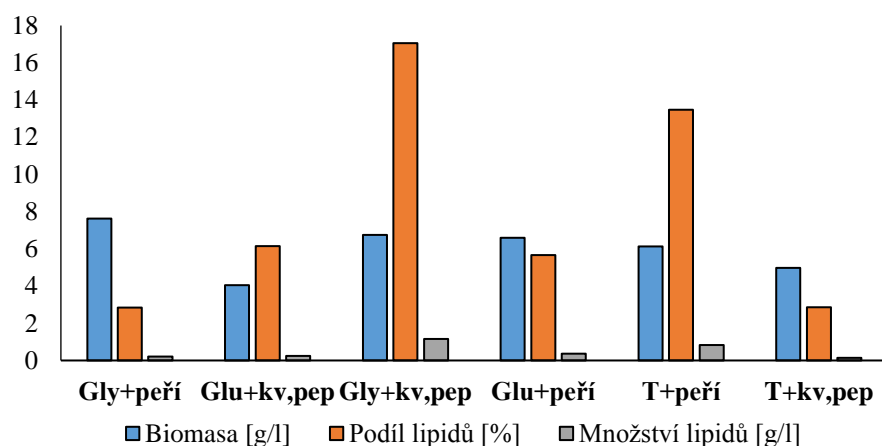
Obrázek č. 44: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Metschnikowia chrysoperlae* při poměru C/N 97

5.5.2 Kultivace při poměru C/N 150

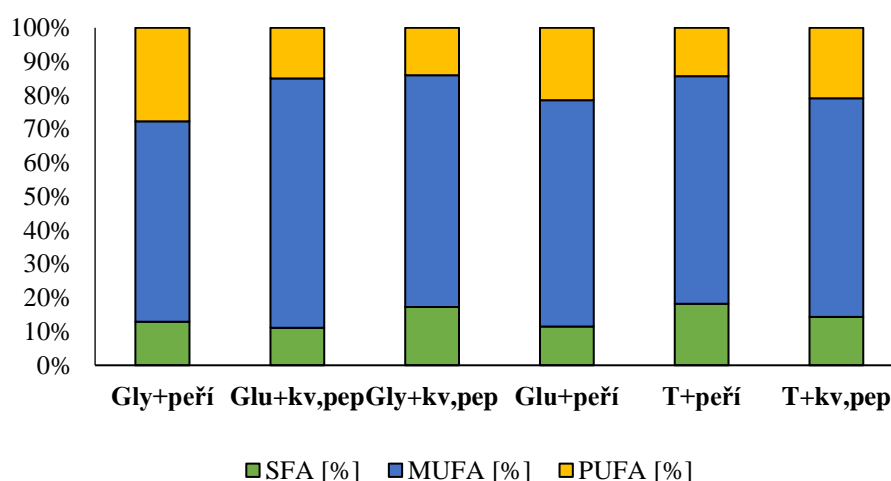
Naměřená biomasa v případě poměru C/N 150 byla u většiny vzorků podobná, viz (Obrázek č. 45). Výjimku tvoří kultivace v mediu složeném z glukózy a kvasničného autolyzátu společně s peptonem, kde hodnota biomasy je nejnižší. Procentuální zastoupení lipidů je nejvyšší při využití živného média tvořeného z glycerolu a kvasničného autolyzátu spolu s peptonem. Zároveň nejnižší zaznamenaný podíl lipidů je při kultivaci v produkčním mediu z glycerolu a odpadního peří. Zastoupení jednotlivých MK je znázorněno na (Obrázek č. 46). Poměr SFA, MUFA a PUFA je při kultivaci v poměru C/N 150 poměrně totožný. Výjimku ovšem tvoří kultivace v mediu složeném z glycerolu a odpadního peří, kde je nejvyšší zastoupení PUFA a nejnižší zastoupení MUFA oproti ostatním vzorkům.

(Obrázek č. 47) udává celkovou hodnotu biomasy, koenzymu Q a ergosterolu. V případě kultivace v médiích tvořících jako zdroj uhlíku hydrolyzovaný tuk lze pozorovat nejvyšší

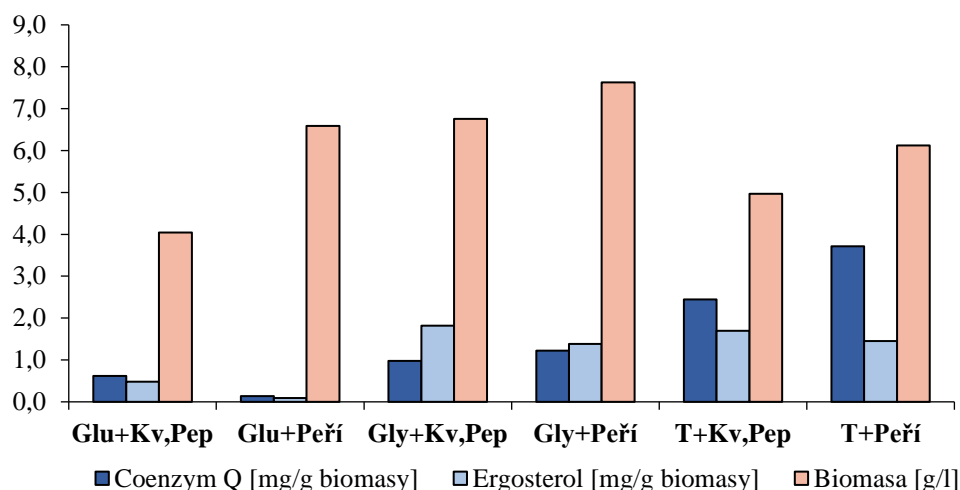
hodnoty koenzymu Q. Nejvyšší hodnota ergosterolu byla zaznamenána při využití média obsahujícího glycerol a kvasničný autolyzát společně s peptonem. Nejnižší hodnota obou sledovaných metabolitů byla naměřena v případě kultivace s využitím média tvořícího glukózu jako zdroj uhlíku a odpadní peří jako zdroj dusíku.



Obrázek č. 45: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene *Metschnikowia chrisoperlae* při poměru C/N 150



Obrázek č. 46: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene *Metschnikowia chrisoperlae* při poměru C/N 150



Obrázek č. 47: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene *Metschnikowia chrysoperlae* při poměru C/N 150

5.6 Porovnání výsledků s rostlinnými oleji a másly

Analýza MK použitých kmenů kvasinek byla porovnána s rostlinnými oleji a másly. Mezi přibližně shodující se složení MK se řadí olivový, brazilský, avokádový olej a kakaové máslo viz (Tabulka č. 9) a (Tabulka č. 10). U kmene *R. toruloides* byla největší shoda MK zaznamenána s olivovým a brazilským olejem. V případě kmene *Y. lipolytica* byla jediná shoda naměřena s avokádovým olejem. Použité kvasinky z rodu *Metschnikowia* vyprodukovaly MK, které se při využití různých zdrojů uhlíku a dusíku, v poměrech C/N 97, 150 nejvíce shodovaly s avokádovým olejem. Jeden ze vzorků daného rodu prokázal také přibližnou shodu s kakaovým máslem.

Tabulka č. 9: Porovnání výsledného % zastoupení MK lipidů s olivovým olejem, brazilským olejem a kakaovým máslem [29, 30]

MK [%]	Olivový olej	Vzorek 6	Brazilský olej	Vzorek TP 3	Kakaové máslo	Vzorek M86
C14:0						2,7
C16	10,9 – 11,1	10,5	14-16	15,5	26	27,9
C16:1	0,1				0,3	3
C18	4,3	5,4	6-10	9,2	34,5	22
C18:1C	75,6 -75,7	74,1	29-48	48,6	34,5	37,8
C18:2C	4,8	5,5	30-47	17,7	3,2	4,8
C18:3C	0,3	1,3				0,7
C18:2t				5,1	1	
C20:0				2,5		
C20:2		2,9				
C24:0		0,5		1,3		

*pozn.: Vzorek 6- *R. toruloides* C/N 25 glycerol + síran amonný, Vzorek TP3- *R. toruloides* C/N 100 glycerol + peří, Vzorek M86- *M. chrysoperlae* C/N 97 hydr. tuk + kvas. autolýzát, pepton

Tabulka č. 10: Porovnání výsledného procentuálního zastoupení MK s avokádovým olejem [31]

MK [%]	Avok. olej	Vz. M81	Vz. M83	Vz. M84	Vz. M081	Vz. M084	Vz. M73	Vz. M76	Vz. M074	Vz. M075	Vz. M076	Vz. Y21
C14:0					0,5					0,9		
C16	10-20	7,2	8,7	9,7	14,7	10,4	11,4	13,2	13,6	10,8	13,2	15,1
C16:1	4-9	5,6	4,8	7,8	6,9	5,9	6,6	5,3	5,3	5,2	5,3	8,6
C18	0,4-1,0	3,5	3,7	1,5	2,1	1,2	2,1		2,2	2,8		4,8
C18:1C	56-78	62,6	58,3	65,6	61,8	61,1	59,6	56,7	58,3	60,8	56,7	61,1
C18:2C	10-15	16,4	24,6	15,3	12	19,9	18,7	24,8	20,6	19,2	24,8	10,4
C18:3d3	0,2-2				1,7							
C18:2t					0,4							
C20:2						1,5						
C24:0		0,3					0,3			0,5		

*pozn.: Vzorek M81- *M. chrysoperlae* C/N 97 glycerol + peří, M83- *M. chrysoperlae* C/N 97 glycerol + kvas. autolyzát, pepton, M84- *M. chrysoperlae* C/N 97 glukóza + peří, M081- *M. chrysoperlae* C/N 150 glycerol + kvas. autolyzát, pepton, M084- *M. chrysoperlae* C/N 150 glukóza + peří, M73- *M. pulcherrima* C/N 97 glukóza + peří, M76- *M. pulcherrima* C/N 97 glukóza + kvas. autolyzát, pepton, M074- *M. pulcherrima* C/N 150 glukóza + peří, M075- *M. pulcherrima* C/N 150 hydr. tuk + kvas. autolyzát, pepton, M076- *M. pulcherrima* C/N 150 hydr. tuk + peří, Y21- *Y. lipolytica* C/N 100 glukóza + síran amonný

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce byla produkce lipidů různými druhy kvasinek. Pro kultivaci byly využity kvasinky kmene *Rhodosporidium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Metschnikowia chrisoperlae*. Tyto kvasinkovité mikroorganismy jsou charakteristické tvorbou lipidů ve vysoké míře a mají všestranné použití. Podíl jejich celkových lipidů může dosahovat hodnot až 70 % z celkové biomasy. Pro vytvoření co nejvyššího procentuálního podílu lipidů byly využívány kultivace s různými C/N poměry a sledovány optimální podmínky pro jejich maximální tvorbu, při působení různých zdrojů uhlíku a dusíku, s využitím odpadních substrátů.

Kultivace probíhaly při poměrech C/N 13, C/N 25, C/N 50 a C/N 100. Účinky poměru C/N byly testovány pro kvasinky *R. toruloides* a *Y. lipolytica* v produkčních médiích, kde zdrojem uhlíku byla glukóza, glycerol a odpadní živočišný tuk, a zdrojem dusíku močovina, síran amonný, kvasničný autolyzát, pepton a odpadní peří.

U kmene *Rhodosporidium toruloides* v případě využití klasických zdrojů uhlíku a dusíku byla nejvyšší hodnota lipidů stanovena na 12,27 %, živné médium bylo složeno z glukózy a síranu amonného při poměru C/N 50. S využitím odpadních substrátů, kde byl živočišný tuk zdrojem uhlíku, byl u daného kmene nejvyšší procentuální podíl lipidů, a to ve výši 73,53 %. Těchto výsledků bylo dosaženo při poměru C/N 100 a média, které obsahovalo hydrolyzovaný tuk s kvasničným autolyzátem. V případě využití odpadního tuku byla tato hodnota nejvyšší navzdory nejnižší produkci biomasy. Použitím odpadního peří tvořila maximální hodnota lipidů 4,54 % v biomase, kde živné médium bylo složeno z glycerolu a odpadního peří při poměru C/N 50.

U kmene *Yarrowia lipolytica* bylo dosaženo maximálních hodnot lipidů ve výši 10,93 % v případě média využívajícího klasický zdroj uhlíku, které se skládalo z glycerolu a kvasničného autolyzátu, při poměru C/N 25. V případě využití odpadního živočišného tuku jakožto zdroje uhlíku, byl největší podíl naměřených lipidů 43,32 %, kde médium bylo složeno z hydrolyzovaného tuku společně s kvasničným autolyzátem C/N 50. Nastal zde stejný příklad jako u předešlého kmene kvasinky, kde při využití odpadního substrátu byla naměřena maximální celková hodnota lipidů, ovšem navzdory celkovému objemu biomasy. V případě využití odpadního peří jakožto zdroje dusíku, byla nejvyšší naměřená hodnota lipidů 2,83 % na biomasu, kde produkční médium bylo složeno z glycerolu a odpadního peří při poměru C/N 50. V případě kultivace této kvasinky na odpadním peří byla hodnota lipidů maximální a celková biomasa byla opět minimální.

Kvasinky rodu *Metschnikowia* byly kultivovány v živných médiích obsahujících rovněž glukózu, glycerol a hydrolyzovaný tuk jakožto zdroj uhlíku, a kvasničný extrakt společně s peptonem a odpadním peřím jakožto zdroje dusíku v poměrech C/N 97 a C/N 150. U kmene *Metschnikowia chrisoperlae* byla naměřena největší hodnota lipidů 49,27 % v případě využití obou odpadních substrátů, kde živné médium bylo složeno z hydrolyzovaného tuku a odpadního peří při poměru C/N 97.

U kmene *Metschnikowia pulcherrima* byl stanoven maximální podíl lipidů v biomase na 47,62 % v poměru C/N 97, kde produkční médium bylo složeno z odpadního tuku a kvasničného autolýzátu společně s peptonem. Hodnota biomasy byla opět nejnižší ze všech poměrů.

Mezi mastné kyseliny, které se nejčastěji v kvasinkách hromadily, se řadila kyselina palmitová, kyselina palmitolejová, kyselina stearová, kyselina olejová a kyselina linolová aj. Analýza složení mastných kyselin potvrdila, že za některých podmínek kultivace určitým kmenem kvasinky, by mohly být vytvořené lipidy jistou alternativou rostlinných olejů či másla.

MK několika druhů rostlinných olejů a másel byly porovnány s MK vyprodukovanými výše uvedenými kvasinkami. Nejvyšší shoda byla zaznamenána u olivového, brazilského, avokádového oleje a kakaového másla. Profil mastných kyselin v lipidech produkovaných kmenem *R. toruloides* byl velmi podobný složení potravinářského olivového a brazilského oleje. Ovšem nejvíce vzorků bylo téměř shodných s avokádovým olejem, a to především v případě kultivace kvasinek rodu *Metschnikowia*. Jedna shoda s uvedeným olejem byla zaznamenána také při kultivaci kmene *Y. lipolytica*. Složení mastných kyselin kakaového másla nejvíce odpovídal kmen *M. chrisoperlae*. Z uvedených příkladů vyplývá, že lipidy akumulované při kultivaci v určitých poměrech C/N, mohou sloužit jako náhrada výše uvedených cenných surovin.

Experimenty provedené pro účely sepsání této bakalářské práce prezentovaly, že maximální a užitečná produkce lipidů závisí na různých zdrojích uhlíku a dusíku, na jejich poměru C/N a kmenu kvasinek. V laboratorním měřítku byly odpadní materiály přeměněny na užitečné bioprodukty. Tento proces kultivace může být v budoucnu potenciálně využit pro produkci lipidů tvořených určitými typy kvasinek, které jsou schopné využít různé zdroje uhlíku či dusíku v kultivačním médiu. Tento bioproces je vhodný pro nakládání s odpady, je šetrný k životnímu prostředí a poskytuje dobrou návratnost investic.

7 Seznam použitých zdrojů

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, 1990. Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov. Bratislava: Alfa. ISBN 80-05-00644-6.
- [2] JOHNSON, Eric A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(2), 503–517. DOI: 10.1007/s00253-012-4497-y. ISBN 10.1007/s00253-012-4497-y.
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [4] SHURSON, G.C., 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 235, 60-76 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010. ISSN 03778401. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840117308398>.
- [5] WALKER, Graeme M., c1998. Yeast physiology and biotechnology. New York: J. Wiley. ISBN 04-719-6446-8.
- [6] KHOT, Mahesh, Gouri RAUT, Debashish GHOSH, Manuel ALARCÓN-VIVERO, David CONTRERAS a Ameeta RAVIKUMAR, 2020. Lipid recovery from oleaginous yeasts: Perspectives and challenges for industrial applications. *Fuel* [online]. 259 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/j.fuel.2019.116292. ISSN 00162361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236119316461>.
- [7] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ, 2015. Základy obecné mikrobiologie. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [8] WILSON, Wayne A., Peter J. ROACH, Manuel MONTERO, Edurne BAROJA-FERNÁNDEZ, Francisco José MUÑOZ, Gustavo EYDALLIN, Alejandro M. VIALE a Javier POZUETA-ROMERO, 2010. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 34(6), 952-985 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x>.
- [9] BASAŘOVÁ, Gabriela, 2010. Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna, VRANÁ, Dagmar, ed. Kvasinky ve výzkumu a praxi. Praha: Academia, 1986.
- [11] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDO VÁ, 1999. Úvod do biologie kvasinek. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-990-1.
- [12] BERRY, David R., Inge RUSSELL a Graham G. STEWART. Yeast biotechnology. Boston: Allen & Unwin, 1987. ISBN 978-94-009-3119-0.
- [13] VOET, D. a J. VOETOVÁ. Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.

- [14] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. Dotisk 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [15] MARTÍNEZ, Elia, Vijaya RAGHAVAN, Fernando GONZÁLEZ-ANDRÉS a Xiomar GÓMEZ. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16(12), 9385-9405. DOI: 10.3390/ijms16059385. ISSN 1422-0067.
- [16] OCHSENREITHER, Katrin, Claudia GLÜCK, Timo STRESSLER, Lutz FISCHER a Christoph SYLDATK. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7, -. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01539. ISSN 1664-302x.
- [17] REHM, Hans-Jürgen. a Gerald REED. *Biotechnology: Products of Secondary Metabolism*. 2nd, completely rev. ed. New York: VCH, 2001. ISBN 35-272-8317-X.
- [18] WHIFFIN, Fraeya, Fabio SANTOMAURO a Christopher J. CHUCK. Toward a microbial palm oil substitute: oleaginous yeasts cultured on lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2016, 10(3), 316-334. DOI: 10.1002/bbb.1641. ISSN 1932104x.
- [19] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. Bratislava: Alfa, 1982. Edícia potravinárskej literatúry.
- [20] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, 1957. Edícia literatúry pre potravinársky priemysel.
- [21] SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *European Journal of Biochemistry*. 1994, 223(1), 7-24.
- [22] TALBOT, N., J. P. SMOL a J. KRISTIANSEN. *Molecular and cellular biology of filamentous fungi: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2001. Systematics Association special volume, 75.
- [23] DELLAPENNA, D. Carotenoid Synthesis and Function in Plants: Insights from Mutant Studies in *Arabidopsis thaliana*. *The Photochemistry of Carotenoids*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, 21.
- [24] BRITTON, G., S. LIAAEN-JENSEN a H. PFANDER. *Carotenoids handbook: molecular aspects and health issues*. Boston: Birkhäuser Verlag, c2004.
- [25] OSORIO-GONZÁLEZ, Carlos S., Krishnamoorthy HEGDE, Pedro FERREIRA, Satinder Kaur BRAR, Azadeh KERMANSHAIPOUR, Carlos Ricardo SOCCOL a Antonio AVALOS-RAMÍREZ, 2019. Lipid production in *Rhodospiridium toruloides* using C-6 and C-5 wood hydrolysate: A comparative study. *Biomass and Bioenergy* [online]. 130 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.105355. ISSN 09619534. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953419303046>.
- [26] IMATOUKENE, Nabila, Mohamed KOUBAA, Emile PERDRIX, Mohammed BENALI a Eugène VOROBIEV, 2020. Combination of cell disruption technologies for lipid

- recovery from dry and wet biomass of *Yarrowia lipolytica* and using green solvents. *Process Biochemistry* [online]. 90, 139-147 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.11.011. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511319310001>.
- [27] KANG, Young Min, Ji Eun CHOI, Richard KOMAKECH, et al. Characterization of a novel yeast species *Metschnikowia persimmonesis* KCTC 12991BP (KIOG G15050 type strain) isolated from a medicinal plant, Korean persimmon calyx (*Diospyros kaki* Thumb). *AMB Express*. 2017, 7(1). DOI: 10.1186/s13568-017-0503-1. ISBN 10.1186/s13568-017-0503-1.
- [28] LACHANCE, Marc-André. *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*. 2016, 33(11), 563-574. DOI: 10.1002/yea.3208. ISSN 0749503X.
- [29] ALVES, Anselmo Queiroz, Valdemiro Amaro DA SILVA, Alexandre José Silva GÓES, Mariza Severina SILVA, Gibson Gomes DE OLIVEIRA, Isla Vanessa Gomes Alves BASTOS, Antonio Gomes DE CASTRO NETO a Antonio José ALVES, 2019. The Fatty Acid Composition of Vegetable Oils and Their Potential Use in Wound Care. *Advances in Skin & Wound Care* [online]. 32(8), 1-8 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1097/01.ASW.0000557832.86268.64. ISSN 1527-7941. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00129334-201908000-00010>.
- [30] BAILEY, Alton Edward a Fereidoon SHAHIDI, c2005. *Bailey's industrial oil & fat products*: edited by Fereidoon Shahidi. 6th ed. Hoboken, N.J.: John Wiley. ISBN 9780471385509.
- [31] GUNSTONE, Frank D., ed., 2011. *Vegetable Oils in Food Technology* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1002/9781444339925. ISBN 9781444339925.

8 Seznam použitých zkratk

C/N	Poměr atomu uhlíku k dusíku
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MK	Mastné kyseliny
MUFA	Mononenasycené mastné kyseliny
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
SFA	Nasycené mastné kyseliny

9 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Srovnání buněčné stěny oleogenních a neoleogenních kvasinek [6]	13
Obrázek č. 2: Glycerol a obecná schéma mastných kyselin a triacylglycerolů.....	18
Obrázek č. 3: Schéma biosyntézy mastných kyselin [13]	19
Obrázek č. 4: Přenos acetylové jednotky [19]	20
Obrázek č. 5: Reakce prodlužující řetězec karboxylových kyselin [19]	21
Obrázek č. 6: Všeobecný model biosyntézy sterolů <i>Torulopsis glabrata</i> [19]	23
Obrázek č. 7: Struktura vybraných karotenoidů [24]	25
Obrázek č. 8: <i>Rhodosporidium toruloides</i> na petriho misce	26
Obrázek č. 9: Životní cyklus <i>Yarrowia lipolytica</i> [1]	27
Obrázek č. 10: <i>Yarrowia lipolytica</i> na petriho misce	28
Obrázek č. 11: Kultivace <i>Rhodosporidium toruloides</i> C/N 25	35
Obrázek č. 12: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 13	42
Obrázek č. 13: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 13	42
Obrázek č. 14: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N13	42
Obrázek č. 15: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 25	43
Obrázek č. 16: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 25	44
Obrázek č. 17: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 25	44
Obrázek č. 18: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 50	45
Obrázek č. 19: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 50	45

Obrázek č. 20: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 50	46
Obrázek č. 21: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 100	47
Obrázek č. 22: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 100	47
Obrázek č. 23: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Rhodosporidium toruloides</i> při poměru C/N 100	47
Obrázek č. 24: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 13	48
Obrázek č. 25: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 13	49
Obrázek č. 26: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N13	49
Obrázek č. 27: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 25	50
Obrázek č. 28: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 25	50
Obrázek č. 29: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 25	51
Obrázek č. 30: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 50	52
Obrázek č. 31: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 50	52
Obrázek č. 32: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 50	52
Obrázek č. 33: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 100	53
Obrázek č. 34: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 100	54

Obrázek č. 35: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Yarrowia lipolytica</i> při poměru C/N 100	54
Obrázek č. 36: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i> při poměru C/N 97	55
Obrázek č. 37: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i> při poměru C/N 97	55
Obrázek č. 38: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Metschnikowia pullcherima</i> při poměru C/N 97	56
Obrázek č. 39: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i> při poměru C/N 150	57
Obrázek č. 40: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i> při poměru C/N 150	57
Obrázek č. 41: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Metschnikowia pulcherrima</i> při poměru C/N 150	57
Obrázek č. 42: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Metschnikowia chrisoperlae</i> při poměru C/N 97	58
Obrázek č. 43: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Metschnikowia chrisoperlae</i> při poměru C/N 97	59
Obrázek č. 44: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> při poměru C/N 97	59
Obrázek č. 45: Grafické znázornění produkce lipidů u kmene <i>Metschnikowia chrisoperlae</i> při poměru C/N 150	60
Obrázek č. 46: Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech u kmene <i>Metschnikowia chrisoperlae</i> při poměru C/N 150	60
Obrázek č. 47: Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů u kmene <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> při poměru C/N 150	61

10 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Koncentrace složek sušiny v kvasničné buňce [3]	14
Tabulka č. 2: Různé zdroje uhlíku pro růst kvasinek [5].....	16
Tabulka č. 3: Složení tekutého média Inokulum	35
Tabulka č. 4: Složení tekutého média Inokulum pro rod <i>Metchnikowia</i>	36
Tabulka č. 5: Složení produkční média C/N 13 pro kmeny <i>Y. lipolytica</i> a <i>R.toruloides</i>	37
Tabulka č. 6: Složení produkční média pro kmen <i>M. pullcherima</i> a <i>M. chrysoperlae</i> C/N 97	38
Tabulka č. 7: Složení mobilní fáze A a B	40
Tabulka č. 8: Gradiendový program pro HPLC analýzu	40
Tabulka č. 9: Porovnání výsledného % zastoupení MK lipidů s olivovým olejem, brazilským olejem a kakaovým máslem [29, 30]	62
Tabulka č. 10: Porovnání výsledného procentuálního zastoupení MK s avokádovým olejem [31]	63

11 Přílohy

Příloha č. 1: Názvy mastných kyselin použitých pro srovnání

C14:0	kyselina myristová
C16	kyselina palmitová
C16:1	kyselina palmiolejová
C18	kyselina stearová
C18:1C	kyselina olejová
C18:2C	kyselina linolová
C18:3d3	kyselina α -linnolenová
C18:2t	kyselina linolelaidová
C20:2	kyselina eikosadienová
C24:0	kyselina lignocerová